

(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2018-526362

(P2018-526362A)

(43) 公表日 平成30年9月13日 (2018.9.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 17/14	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 127 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-507599 (P2018-507599)	(71) 出願人	505346702
(86) (22) 出願日	平成28年8月15日 (2016.8.15)		ザ トラスティーズ オブ コロンビア
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月9日 (2018.4.9)		ユニヴァーシティ イン ザ シティ オブ
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/047053		ニューヨーク
(87) 国際公開番号	W02017/031067		アメリカ合衆国, ニューヨーク州 100
(87) 国際公開日	平成29年2月23日 (2017.2.23)		27, ニューヨーク, ウェスト 116番
(31) 優先権主張番号	62/205,476		ストリート 535, ロウ メモリアル
(32) 優先日	平成27年8月14日 (2015.8.14)		ライブラリー 412
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107766
			弁理士 伊東 忠重
		(74) 代理人	100070150
			弁理士 伊東 忠彦
		(74) 代理人	100091214
			弁理士 大貫 進介
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 円形脱毛症の処置のためのバイオマーカー

(57) 【要約】

本開示の主題は、円形脱毛症の改善された診断及び予後判定、並びに、この疾患に対する効果的な処置を可能にするバイオマーカーに関し、そのような処置に応答する患者亜集団を同定する能力を持つバイオマーカーを組み込む方法、及び、そのような処置の進展を追跡する能力を持つバイオマーカーを組み込む方法を含む。

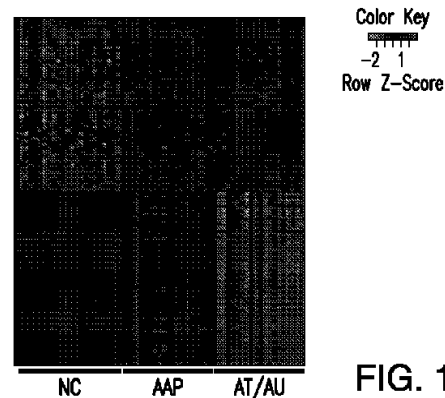


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象者の円形脱毛症（A A）を処置する方法であって、

（a）前記対象者の A A 疾患重症度を、前記疾患重症度を示すバイオマーカーを検出することによって同定するステップ、及び

（b）同定された疾患重症度に適切な治療的介入を前記対象者に施すステップ、を含む、方法。

【請求項 2】

対象者の円形脱毛症（A A）を処置する方法であって、

（a）A A を有する対象者の J A K インヒビター処置に応答する傾向を、前記傾向を示すバイオマーカーを検出することによって同定するステップ、及び 10

（b）前記対象者が前記インヒビターに応答する傾向を、同定されたバイオマーカーが示す場合に、J A K インヒビターを前記対象者に投与するステップ、を含む、方法。

【請求項 3】

対象者の円形脱毛症（A A）を処置する方法であって、

（a）J A K インヒビターを前記対象者に投与するステップ、及び

（b）J A K インヒビター処置への応答性を示すバイオマーカーを検出するステップ、及び、

（c）その後、（1）前記 J A K インヒビターの投与を続けること、（2）前記 J A K インヒビターの投与を変更すること、又は（3）前記 J A K インヒビターの投与をやめることのいずれかによって、前記応答性に基づいて前記 J A K インヒビターの投与を適合させるステップ、 20
を含む、方法。

【請求項 4】

前記バイオマーカーを検出することは、前記対象者から得られたサンプルに対して実行され、前記サンプルは、皮膚、血液、血清、血漿、尿、唾液、痰、粘液、精液、羊水、口腔洗浄液及び気管支洗浄液からなる群から選択される、請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記対象者は、ヒトである、請求項 4 に記載の方法。 30

【請求項 6】

前記サンプルは、皮膚サンプルである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記サンプルは、血清サンプルである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記バイオマーカーは、遺伝子発現シグニチャである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記遺伝子発現シグニチャは、以下の遺伝子の群：K R T 関連遺伝子、C T L 関連遺伝子及び I F N 関連遺伝子、のうちの一つ又はそれ以上の遺伝子発現情報を含む、請求項 8 に記載の方法。 40

【請求項 10】

前記 K R T 関連遺伝子は、D S G 4、H O X C 3 1、K R T 3 1、K R T 3 2、K R T 3 3 B、K R T 8 2、P K P 1 及び P K P 2 を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 C T L 関連遺伝子は、C D 8 A、G Z M B、I C O S 及び P R F 1 を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 I F N 関連遺伝子は、C X C L 9、C X C L 10、C X C L 11、S T A T 1 及び M X 1 を含む、請求項 9 に記載の方法。 50

【請求項 13】

前記遺伝子発現シグニチャは、円形脱毛症疾患活性係数（A L A D I N）である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記遺伝子発現シグニチャは、表 A に定められる一つ又はそれ以上の遺伝子を含む円形脱毛症遺伝子シグニチャ（A A G S）である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 15】

前記遺伝子発現シグニチャは、I K Z F 1、D L X 4 又はそれらの組み合わせである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

検出は、核酸ハイブリダイゼーションアッセイによって実行される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 17】

検出は、マイクロアレイ解析によって実行される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 18】

検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）又は核酸シーケンシングによって実行される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 19】

前記バイオマーカーはタンパク質である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 20】

前記タンパク質の存在は、前記タンパク質と特異的に結合する試薬を使用して検出される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記試薬は、モノクローナル抗体若しくはその抗原結合フラグメント、又はポリクローナル抗体若しくはその抗原結合フラグメントである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記タンパク質の存在は、酵素結合免疫吸着測定（E L I S A）、免疫蛍光測定、又はウェスタンブロットアッセイによって検出される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

対象者の円形脱毛症（A A）を処置するためのキットであって、

（a）対象者の疾患重症度を示すバイオマーカーを検出するために有用な、一つ又はそれ以上の検出試薬、及び

（b）A A を処置するために有用な、一つ又はそれ以上の処置試薬、を含む、キット。

【請求項 24】

対象者の円形脱毛症（A A）を処置するためのキットであって、

（a）前記対象者の、A A を処置するために有用な処置試薬に応答する傾向を示すバイオマーカーを検出するために有用な、一つ又はそれ以上の検出試薬、及び

（b）A A を処置するために有用な、一つ又はそれ以上の処置試薬、を含む、キット。

【請求項 25】

一つ又はそれ以上のプローブセット、アレイ／マイクロアレイ、バイオマーカー特異的抗体及び／又はビーズを更に含む、請求項 23 又は請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

当該キットの使用のための一組の説明書を更に含む、請求項 23 又は請求項 24 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

関連出願との相互参照

本願は、2015年8月14日に提出した米国仮特許出願第62/205,476号に基づく優先権を主張するものであり、その全内容を参照により本願において援用する。

【0002】

助成金に関する情報

本発明は、国立衛生研究所 (the National Institutes of Health) により与えられたNIH Grant Numbers R01AR056016、R21AR061881及び5U01AR067173の下で政府の支援により行われた。政府は本発明について一定の権利を有している。

【0003】

はじめに

本明細書において開示される主題は、円形脱毛症の改善された診断及び予後判定、並びに、この疾患に対する効果的な処置を可能にするバイオマーカーに関し、そのような処置に応答する患者亜集団を同定する能力を持つバイオマーカーを組み込む方法、及び、そのような処置の進展を追跡する能力を持つバイオマーカーを組み込む方法を含む。

【背景技術】

【0004】

円形脱毛症 (AA) は、毛包が免疫攻撃の標的である自己免疫性の皮膚疾患である。患者は、通常は頭皮に丸い又は卵形の脱毛の部分の特徴的に呈し、この脱毛の部分は、自然に消散する、存続する又は進行して、頭皮又は体全体を巻き込み得る。この疾患の3つの主要な表現型変異体は、頭皮の又は顎鬚領域内の小さい卵形の領域に局在することが多い斑状のAA (AAP)、頭皮全体を巻き込む全頭脱毛症 (AT)、及び、体表面全体を巻き込む全身脱毛症 (AU) である。

【0005】

現在、AAに対してFDAが承認した薬剤はなく、処置は経験的であることが多いが、典型的には、観察、病巣内ステロイド、外用免疫療法又は証明されていない有効性の広範な免疫抑制処置を伴う。より重症な形態の疾患であるAU及びATは、処置に対して不応性であることが多い。さらに、皮膚科医及び治療医の間での一般的な仮定は、長期にわたるAU及びATが回復不能になること又は頭皮を「燃え尽きた」状態に変えることであり、これは、罹患期間と処置に対する応答性の逆相関によって裏付けられている。その高い罹患率にもかかわらず、疾患の重症度、並びに、疾患に対する効果的な処置を同定するバイオマーカーが依然として必要とされており、そのような処置に応答する患者亜集団を同定する能力を持つバイオマーカーを組み込む方法、及び、そのような処置の進展を追跡する能力を持つバイオマーカーを組み込む方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本開示は、円形脱毛症の改善された診断及び予後判定、並びに、疾患に対する効果的な処置を可能にするバイオマーカーに関する。特定の実施形態では、対象者の円形脱毛症 (AA) を処置する方法は、上記の対象者のAA疾患重症度を、該疾患重症度を示すバイオマーカーを検出することによって同定するステップ、及び、同定された疾患重症度に適切な治療的介入を上記の対象者に施すステップを含む。本開示の主題は、さらに、対象者のAAを処置する方法を提供し、当該方法は、AAを有する対象者のJAKインヒビター処置に応答する傾向を、該傾向を示すバイオマーカーを検出することによって同定するステップ、及び、対象者がインヒビターに応答する傾向を、同定されたバイオマーカーが示す場合に、JAKインヒビターを上記の対象者に投与するステップを含む。本開示の主題は、さらに、対象者の円形脱毛症 (AA) を処置する方法を提供し、当該方法は、AAを有する対象者にJAKインヒビターを投与するステップ；及び、JAKインヒビター処置に対する応答性を示すバイオマーカーを検出するステップ；を含む。

【0007】

特定の実施形態では、上記の本開示のバイオマーカーの検出は、対象者から得られたサ

10

20

30

40

50

ンプルに対して実行され、サンプルは、皮膚、血液、血清、血漿、尿、唾液、痰、粘液、精液、羊水、口腔洗浄液及び気管支洗浄液からなる群から選択される。特定の実施形態では、対象者はヒトである。特定の実施形態では、サンプルは皮膚サンプルである。特定の実施形態では、サンプルは血清サンプルである。特定の実施形態では、バイオマーカーは遺伝子発現シグニチャである。特定の実施形態では、遺伝子発現シグニチャは、以下の遺伝子の群：K R T 関連遺伝子；C T L 関連遺伝子；及び I F N 関連遺伝子；のうちの一つ又はそれ以上の遺伝子発現情報を含む。特定の実施形態では、K R T 関連遺伝子は、D S G 4、H O X C 3 1、K R T 3 1、K R T 3 2、K R T 3 3 B、K R T 8 2、P K P 1 及び P K P 2 を含む。特定の実施形態では、C T L 関連遺伝子は、C D 8 A、G Z M B、I C O S 及び P R F 1 を含む。特定の実施形態では、I F N 関連遺伝子は、C X C L 9、C X C L 1 0、C X C L 1 1、S T A T 1 及び M X 1 を含む。特定の実施形態では、遺伝子発現シグニチャは、円形脱毛症疾患活性指数（A L A D I N）である。特定の実施形態では、遺伝子発現シグニチャは、表 A に定められる一つ又はそれ以上の遺伝子を含む円形脱毛症遺伝子シグニチャ（A A G S）である。特定の実施形態では、遺伝子発現シグニチャは、I K Z F 1、D L X 4 又はそれらの組み合わせである。

10

【0008】

特定の実施形態では、本開示のバイオマーカーの検出は、核酸ハイブリダイゼーションアッセイによって実行される。特定の実施形態では、検出は、マイクロアレイ解析によって実行される。特定の実施形態では、検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）又は核酸シーケンシングによって実行される。特定の実施形態では、バイオマーカーはタンパク質である。特定の実施形態では、タンパク質の存在は、タンパク質と特異的に結合する試薬を使用して検出される。特定の実施形態では、試薬は、モノクローナル抗体若しくはその抗原結合フラグメント、又は、ポリクローナル抗体若しくはその抗原結合フラグメントである。特定の実施形態では、検出は、酵素結合免疫吸着測定（E L I S A）、免疫蛍光測定又はウェスタンブロットアッセイによって実行される。

20

【0009】

別の態様では、本開示の主題は、対象者の円形脱毛症（A A）を処置するためのキットを提供し、当該キットは、対象者の疾患重症度を示すバイオマーカーを検出するために有用な一つ又はそれ以上の検出試薬、及び、A A を処置するために有用な一つ又はそれ以上の処置試薬を含む。本開示の主題は、さらに、対象者の円形脱毛症（A A）を処置するためのキットを提供してもよく、当該キットは、対象者の、A A を処置するために有用な一つ又はそれ以上の処置試薬に応答する傾向を示すバイオマーカーを検出するために有用な、一つ又はそれ以上の検出試薬、及び、A A を処置するために有用な一つ又はそれ以上の処置試薬を含む。特定の実施形態では、キットは、さらに、一つ又はそれ以上のプローブセット、アレイ／マイクロアレイ、バイオマーカー特異的抗体及び／又はビーズを含む。特定の実施形態では、キットは、さらに、説明書を含む。特定の実施形態では、処置試薬は、J A K インヒビターから選択されてもよい。

30

【0010】

特定の実施形態では、J A K インヒビターは、J a k 1 / J a k 2 / J a k 3 / T y k 2 / S T A T 1 / S T A T 2 / S T A T 3 / S T A T 4 / S T A T 5 a / S T A T 5 b / S T A T 6 / O S M / g p 1 3 0 / L I F R / O S M - R β 遺伝子、又は、J a k 1 / J a k 2 / J a k 3 / T y k 2 / S T A T 1 / S T A T 2 / S T A T 3 / S T A T 4 / S T A T 5 a / S T A T 5 b / S T A T 6 / O S M / g p 1 3 0 / L I F R / O S M - R β タンパク質と相互作用する化合物である。特定の実施形態では、J A K インヒビターは、ルキシソリチニブ（I N C B 0 1 8 4 2 4）、トファシチニブ（C P 6 9 0 5 5 0）、チロホスチン A G 4 9 0（C A S N u m b e r : 1 3 3 5 5 0 - 3 0 - 8）、モメロチニブ（C Y T 3 8 7）、パクリチニブ（S B 1 5 1 8）、バリシチニブ（L Y 3 0 0 9 1 0 4）、フェドラチニブ（T G 1 0 1 3 4 8）、B M S - 9 1 1 5 4 3（C A S N u m b e r : 1 2 7 1 0 2 2 - 9 0 - 2）、レスタウルチニブ（C E P - 7 0 1）、フルダラビン、エピガロカテキン-3-ガラート（E G C G）、ペフィシチニブ、A B T 4 9 4（C

40

50

AS Number: 1310726-60-3)、AT9283 (CAS Number: 896466-04-9)、デセルノチニブ、フィルゴチニブ、ガンドチニブ、INCB39110 (CAS Number: 1334298-90-6)、PF 04965842 (CAS Number: 1622902-68-4)、R348 (R-932348、CAS Number: 916742-11-5; 1620142-65-5)、AZD1480 (CAS Number: 935666-88-9)、セルジュラチニブ、INCB052793、NS018 (CAS Number: 1239358-86-1 (遊離塩基); 1239358-85-0 (HCl))、AC 410 (CAS Number: 1361415-84-0 (遊離塩基)、1361415-86-2 (HCl))、CT1578 (SB1578、CAS Number: 937273-04-6)、JTE052、PF6263276、R548、TG02 (SB1317、CAS Number: 937270-47-8)、ランブリカス・レベラス抽出物、ARN4079、AR13154、UR67767、CS510、VR588、DNX04042、ハイパーフォリン、その誘導体、その重水素化された異形、その塩又はその組み合わせから選択されてもよい。特定の実施形態では、検出試薬は、蛍光試薬、発光試薬、色素、放射性同位体、その誘導体又はその組み合わせから選択されてもよい。

【0011】

例として与えられているが、本発明を記載される特定の実施形態に限定することを意図していない詳細な説明は、添付の図面と組み合わせて理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A】円形脱毛症疾患に特異的なシグニチャを示した図であり、トレーニングセットにおけるAT/AU、AAP及びNCサンプル間のAA特異的疾患シグニチャ内の発現が増加した50の最も発現差異がある遺伝子、及び、発現が減少した50の最も発現差異がある遺伝子のヒートマップである。

【図1B】円形脱毛症疾患に特異的なシグニチャを示した図であり、差次的遺伝子発現の主成分に沿って整列させられたサンプルの発現地形図である。ドットは、発現空間における各サンプルの位置を表しており（白色=NC、青色=AAP、赤色=AT/AU）、ピークのサイズは、領域内のサンプルの数に基づいて生成されている（より並置されたサンプルが生成するピークはより高く広い）。主成分空間は、地形空間内のその位置に基づき、サンプルがコントロール、AAP又はAT/AUであるリスクを反映する単一の数値スコアに凝縮することができる。このコンセンサススコアは、統計的に有意な分別コントロール、AAP及びAT/AUのサンプルコホートを提供する（箱ひげ図）。箱は四分位範囲及び中央値を示し、ひげは5及び95のパーセンタイルを示し、*はNCに対する統計的有意性を示し、†はAAPに対する統計的有意性を示す。

【図2A】全頭脱毛症及び全身脱毛症における増加した遺伝子発現の複雑さ及び持続性炎症の図であり、正常と比較したAT/AU（「AT/AU」）、及び、正常と比較したAAP（「AAP」）における発現差異がある遺伝子のベン図である。ベン図の各セクション内の発現差異がある遺伝子の数が示されている。

【図2B】全頭脱毛症及び全身脱毛症における増加した遺伝子発現の複雑さ及び持続性炎症の図であり、AT/AU、AAP又はNCを有する患者由来の皮膚切片間のCD3浸潤物の毛包周囲/球範囲の病理組織学的スコアである。* $p < 0.01$; ** $p < 0.005$

【図2C】全頭脱毛症及び全身脱毛症における増加した遺伝子発現の複雑さ及び持続性炎症の図であり、HPSスコア0（浸潤なし）から3（重度の浸潤）を反映する代表的な組織学的画像である。

【図2D】全頭脱毛症及び全身脱毛症における増加した遺伝子発現の複雑さ及び持続性炎症の図であり、AT/AU対正常コントロール及びAAP対正常コントロール間で共有されるKEGG経路のリストである。

【図2E】全頭脱毛症及び全身脱毛症における増加した遺伝子発現の複雑さ及び持続性炎

10

20

30

40

50

症の図であり、A T / A U 対正常コントロール（赤）、A A P 対正常コントロール（青）においてアップレギュレートされたK E G G 経路、又は、A T / A U 対正常コントロール及びA A P 対正常コントロール両方における共有された経路のネットワークマップである。

【図 3 A - 1】A A における個々の間で生じる遺伝子発現解析であり、患者を一致させた病変サンプルと非病変サンプルとを比較して、それらを互いに、及び、健常コントロールを描写する遺伝子を同定するヒートマップである。

【図 3 A - 2】A A における個々の間で生じる遺伝子発現解析であり、患者を一致させた病変サンプルと非病変サンプルとを比較して、それらを互いに、及び、健常コントロールを描写する遺伝子を同定するヒートマップである。

【図 3 A - 3】A A における個々の間で生じる遺伝子発現解析であり、患者を一致させた病変サンプルと非病変サンプルとを比較して、それらを互いに、及び、健常コントロールを描写する遺伝子を同定するヒートマップである。

【図 3 B】A A における個々の間で生じる遺伝子発現解析であり、発現差異の第一主成分からの正規化された偏差によって整列させられた患者を一致させた病変（赤色）及び非病変（青色）のサンプルである。対のサンプル間の線の長さは、全てのシグニチャ遺伝子のコンセンサスに基づき、全体的な類似性（より短い線）又は相違性（より長い線）を示している。

【図 3 C】A A における個々の間で生じる遺伝子発現解析であり、正常コントロールサンプル、病変A A P 及び非病変A A P のサンプルの第一の2つの主成分分析を使用したディスプレイは、いずれかのコホートではなく、病変サンプルが病変サンプルとコントロールとの間でクラス形成することを明らかにしている。

【図 3 D】A A における個々の間で生じる遺伝子発現解析であり、病変A A P と非病変A A P のサンプル間の過剰発現した遺伝子及び過少発現した遺伝子の経路及び機能的注釈の分析が、非病変においてアップし且つ病変においてダウンする（赤色のノード）、及び、非病変においてダウンし且つ病変においてアップする（青色のノード）別々の遺伝子のセットを明らかにしている。これらの遺伝子は、示されたエンリッチメント（濃縮）の注釈に関連づけられ（黄色のノード）、その発現プロファイルにおいて反映される病変サンプルと非病変サンプルとの機能的な分子の差を表している。

【図 4 A】A A 表現型と相関する免疫細胞浸潤遺伝子発現シグニチャを示した図であり、対応する免疫マーカーのコンセンサス発現に基づく、患者毎の示された浸潤免疫細胞の相対的推定値である（ヒートマップ、右）。増加している赤色は、増加している浸潤物の量を示す。患者はC D 8 浸潤によってランク付けされている。最高から最低のC D 8 浸潤による患者のランク付けが、母集団のバイアスを明らかにしている。箱ひげ図は、C D 8 浸潤ランクに従った、示された臨床提示の分布を反映している（ランクが低いほど、示す浸潤のレベルは高い）。箱は四分位範囲及び中央値を示し、ひげは5及び95のパーセンタイルを示し、*は統計的有意性 $p = 0.005$ を示し、**は $p < 1 \times 10^{-5}$ を示す。

【図 4 B】A A 表現型と相関する免疫細胞浸潤遺伝子発現シグニチャを示した図であり、コンセンサス発現を使用して、生検サンプルの浸潤汚染が各提示コホート（A A P = 斑状、（左のパイ）、A T / A U = 全頭脱毛症／全身脱毛症（右のパイ））、及び、未罹患コントロールと比較した全浸潤汚染物質における各免疫組織タイプの相対的なシェア（線グラフ）に対して推定されている。

【図 4 C】A A 表現型と相関する免疫細胞浸潤遺伝子発現シグニチャを示した図であり、N C、A A P 及びA T / A U にわたる全サンプルのシグナルの割合として表される、各示された免疫タイプの推定された浸潤における変化である。

【図 5 A】疾患表現型に対応するA L A D I N スコアを示した図であり、A A 及び健常コントロール間の発現差異がある遺伝子の同時発現解析が、20のモジュールの遺伝子を明らかにしている。

【図 5 B】疾患表現型に対応するA L A D I N スコアを示した図であり、A A 及びコントロール間の有意な発現差異における濃縮のための全20の遺伝子モジュールのG S E A が

10

20

30

40

50

、緑色及び茶色のモジュールは比較において最も高度に濃縮されていることを明らかにしている。

【図 5 C】疾患表現型に対応する A L A D I N スコアを示した図であり、これら 2 つのモジュール（円）の経路解析が、いくつかの免疫及び免疫応答の経路（オレンジ色の菱形）の有意な濃縮を明らかにし、G W A S（黄色）、A L A D I N C T L 遺伝子（マゼンタ色）、G W A S ヒットでもある C T L 遺伝子（ピンク色）、及び、A L A D I N I F N 遺伝子（ターコイズ色）において以前に関係づけられた遺伝子を含む。

【図 5 D】疾患表現型に対応する A L A D I N スコアを示した図であり、A L A D I N スコアは、患者の A A 重症度の相対的リスクを同定するために、免疫浸潤及び遺伝子発現によって反映される構造変化を統合した 3 次元において患者サンプルを分類する（黒色：N C、緑色：A A P、赤色：A T / A U）。

【図 5 E】疾患表現型に対応する A L A D I N スコアを示した図であり、疾患期間に関する A U / A T を有する患者由来の C T L（上のパネル）、I F N（中央のパネル）及び K R T（下のパネル）のシグニチャスコアを示している。

【図 6】A A 検証セットを示した図であり、検証データセットにおける 33 のサンプルの樹状図及びヒートマップを示している。ユークリッド距離及び平均連結を使用した階層的クラスタリングを、サンプルをクラスタ形成するために使用された D i s c o v e r y データセットにおける A A 患者及び正常コントロールの間に差次的に発現されたとして同定された 2002 A f f y m e t r i x P S I D を使用して行った。

【図 7 A】A A サンプル間の T 細胞免疫遺伝子シグニチャを示した図であり、各浸潤性免疫組織に特有のシグニチャ遺伝子を使用した A A 患者及び未罹患コントロールの教師なしのコンセンサスクラスタリングが、各サンプルにおける浸潤物の相対的な定量化を可能にしている。このヒートマップでは、赤色はより高い発現を示し、白色はより低い発現を示している。3 つの主要なスーパークラスターの境界が、マーカー発現に基づき、低、中（M e d）及び高の浸潤の相対的レベルとして画定されている。

【図 7 B】A A サンプル間の T 細胞免疫遺伝子シグニチャを示した図であり、3 つの浸潤スーパークラスターが、予後と統計的に有意に関連している。3 x 3 カイ二乗検定が、浸潤の重症度はこれらの患者にわたる A A 表現型の重症度を予測するということを明らかにしている。各セルに表示された数は、付随するスーパークラスターで見出される各臨床提示の割合を表し、例えば、N C サンプルの 72 % が低クラスターで見出された。カイ二乗統計及び付随する p 値が提供されている。

【図 8 A】A A 疾患特異的シグニチャにおけるモジュールが A L A D I N 成分を定めることを示した図であり、樹状図が、遺伝子同時発現クラスタリング結果を反映している。底部に沿って、色付きのバーコードが、この研究で使用した 20 の同時発現されたモジュールを同定した区画を示している。

【図 8 B】A A 疾患特異的シグニチャにおけるモジュールが A L A D I N 成分を定めることを示した図であり、20 のモジュールとの関連性についていくつかの臨床的形質を試験した場合の結果の表を示している。各セルには、対応するモジュールと形質との関連性に対する p 値が表示されている。セルは、関連性の有意性に対応するように増える赤色に色付けされている。

【図 8 C - 1】A A 疾患特異的シグニチャにおけるモジュールが A L A D I N 成分を定めることを示した図であり、A A コホートにおける元の A L A D I N 経路のそれぞれの統計的濃縮を試験する G e n e S e t E n r i c h m e n t A n a l y s e s を示している。未罹患コントロールに対する全ての比較において、予想される方向での I F N、C T L 及び K R T の経路における遺伝子の統計的濃縮があった（I F N 及び C T L が正に濃縮され、K R T が負に濃縮されている）。

【図 8 C - 2】A A 疾患特異的シグニチャにおけるモジュールが A L A D I N 成分を定めることを示した図であり、A A コホートにおける元の A L A D I N 経路のそれぞれの統計的濃縮を試験する G e n e S e t E n r i c h m e n t A n a l y s e s を示している。未罹患コントロールに対する全ての比較において、予想される方向での I F N、C

10

20

30

40

50

T L及びK R Tの経路における遺伝子の統計的濃縮があった（I F N及びC T Lが正に濃縮され、K R Tが負に濃縮されている）。

【図8 C-3】A A疾患特異的シグニチャにおけるモジュールがA L A D I N成分を定めることを示した図であり、A Aコホートにおける元のA L A D I N経路のそれぞれの統計的濃縮を試験するGene Set Enrichment Analysesを示している。未罹患コントロールに対する全ての比較において、予想される方向でのI F N、C T L及びK R Tの経路における遺伝子の統計的濃縮があった（I F N及びC T Lが正に濃縮され、K R Tが負に濃縮されている）。

【図9】A L A D I N成分が、A A表現型及び正常コントロールを区別することを示した図であり、A L A D I NのC T L（上のパネル）、I F N（中央のパネル）及びK R T（下のパネル）の成分を、正常コントロール、A A P及びA U/A Tのサンプル間で比較した。 $*p < 0.05$ ； $**p < 0.0001$ 。

【図10】期間は、A A P患者間のA L A D I N成分スコアに有意に影響しないことを示した図であり、A L A D I NのC T L（上のパネル）、I F N（中央のパネル）及びK R T（下のパネル）の成分を、5年未満又は少なくとも5年の持続期間のA A P患者間で比較した。有意な差は見つからなかった。

【図11 A】C D 8+N K G 2 D+細胞傷害性Tリンパ球が皮膚において蓄積し、A Aマウスにおいて疾患を誘導するのに必要であり且つ十分であることを示した図であり、（K 7 1によってマークされている）毛包の内毛根鞘におけるN K G 2 Dリガンド（H 6 0）の免疫蛍光染色を示している。スケールバー、100 μ m。

【図11 B】C D 8+N K G 2 D+細胞傷害性Tリンパ球が皮膚において蓄積し、A Aマウスにおいて疾患を誘導するのに必要であり且つ十分であることを示した図であり、C 5 7 B L/6、健常C 3 H/He J及びC 3 H/He J A Aマウスの毛包におけるC D 8+N K G 2 D+細胞を示している。上のスケールバー、100 μ m；下のスケールバー、50 μ m。

【図11 C】C D 8+N K G 2 D+細胞傷害性Tリンパ球が皮膚において蓄積し、A Aマウスにおいて疾患を誘導するのに必要であり且つ十分であることを示した図であり、C 3 H/He J A Aマウスにおける皮膚リンパ節腫脹及び細胞過形成を示している。

【図11 D】C D 8+N K G 2 D+細胞傷害性Tリンパ球が皮膚において蓄積し、A Aマウスにおいて疾患を誘導するのに必要であり且つ十分であることを示した図であり、脱毛症マウス対未移植マウスの皮膚及び皮膚排出リンパ節におけるC D 8+N K G 2 D+T細胞の頻度（ボックスの領域の上に示されている数）を示している。

【図11 E】C D 8+N K G 2 D+細胞傷害性Tリンパ球が皮膚において蓄積し、A Aマウスにおいて疾患を誘導するのに必要であり且つ十分であることを示した図であり、C 3 H/He J脱毛症マウスの皮膚リンパ節におけるC D 8+N K G 2 D+T細胞の免疫表現型を示している。

【図11 F】C D 8+N K G 2 D+細胞傷害性Tリンパ球が皮膚において蓄積し、A Aマウスにおいて疾患を誘導するのに必要であり且つ十分であることを示した図であり、C 3 H/He Jの毛包から増殖したR a e-1 t発現真皮鞘細胞（左）、遮断抗N K G 2 D抗体又はアイソタイプのコントロールの存在下での、A Aマウスの皮膚リンパ節から単離されたC D 8+N K G 2 D+T細胞によって誘導される用量依存的特異的細胞溶解（右）を示している。エフェクターターゲット比が、示されているように与えられている。データは平均 $\pm$ s.d.として表されている。

【図11 G】C D 8+N K G 2 D+細胞傷害性Tリンパ球が皮膚において蓄積し、A Aマウスにおいて疾患を誘導するのに必要であり且つ十分であることを示した図であり、全リンパ節（L N）細胞、C D 8+N K G 2 D+T細胞のみ、C D+N K G 2 D-T細胞又はN K G 2 D+を枯渇したリンパ節細胞を皮下注射したC 3 H/He Jマウス（1つの群あたり5匹のマウス）における脱毛を示している。マウスは2つの実験の代表である。 $**P < 0.001$ （フィッシャーの正確確率検定）。

【図12 A】I F N- γ 、I L-2又はI L-15 R β に対する遮断抗体によるA Aの予

防を示し、C 3 H / H e J 移植マウスを、移植の時点から全身的に処置したことを示した図であり、I F N - γ に対する抗体を用いて移植の時点から全身的に処置した C 3 H / H e J 移植マウスにおける A A の発生を示している。

【図 1 2 B】I F N - γ 、I L - 2 又は I L - 1 5 R β に対する遮断抗体による A A の予防を示し、C 3 H / H e J 移植マウスを、移植の時点から全身的に処置したことを示した図であり、I F N - γ に対する抗体を用いて移植の時点から全身的に処置した C 3 H / H e J 移植マウスにおける A A の発生を示している。P B S - 処置マウスと比較した、I F N - γ に対する抗体を用いて処置したマウスの皮膚における C D 8 + N K G 2 D + T 細胞の頻度（ボックスの領域の上に示されている数）を示している。（* P < 0. 0 5、** P < 0. 0 1、*** p < 0. 0 0 1）

10

【図 1 2 C】I F N - γ 、I L - 2 又は I L - 1 5 R β に対する遮断抗体による A A の予防を示し、C 3 H / H e J 移植マウスを、移植の時点から全身的に処置したことを示した図であり、アイソタイプコントロール抗体を用いて、又は、I F N - γ に対する抗体を用いて処置したマウスの皮膚における C D 8 及び M H C のクラス I 及び I I の発現を示す皮膚生検の免疫組織化学染色を示している。スケールバー、1 0 0 μ m。

【図 1 2 D】I F N - γ 、I L - 2 又は I L - 1 5 R β に対する遮断抗体による A A の予防を示し、C 3 H / H e J 移植マウスを、移植の時点から全身的に処置したことを示した図であり、I L - 2 に対する抗体を用いて移植の時点から全身的に処置した C 3 H / H e J 移植マウスにおける A A の発生を示している。

【図 1 2 E】I F N - γ 、I L - 2 又は I L - 1 5 R β に対する遮断抗体による A A の予防を示し、C 3 H / H e J 移植マウスを、移植の時点から全身的に処置したことを示した図であり、I L - 2 に対する抗体を用いて移植の時点から全身的に処置した C 3 H / H e J 移植マウスにおける A A の発生を示している。P B S - 処置マウスと比較した、I L - 2 に対する抗体を用いて処置したマウスの皮膚における C D 8 + N K G 2 D + T 細胞の頻度（ボックスの領域の上に示されている数）を示している。（* P < 0. 0 5、** P < 0. 0 1、*** p < 0. 0 0 1）

20

【図 1 2 F】I F N - γ 、I L - 2 又は I L - 1 5 R β に対する遮断抗体による A A の予防を示し、C 3 H / H e J 移植マウスを、移植の時点から全身的に処置したことを示した図であり、アイソタイプコントロール抗体を用いて、又は、I L - 2 に対する抗体を用いて処置したマウスの皮膚における C D 8 及び M H C のクラス I 及び I I の発現を示す皮膚生検の免疫組織化学染色を示している。スケールバー、1 0 0 μ m。

30

【図 1 2 G】I F N - γ 、I L - 2 又は I L - 1 5 R β に対する遮断抗体による A A の予防を示し、C 3 H / H e J 移植マウスを、移植の時点から全身的に処置したことを示した図であり、I L - 1 5 R β に対する抗体を用いて移植の時点から全身的に処置した C 3 H / H e J 移植マウスにおける A A の発生を示している。

【図 1 2 H】I F N - γ 、I L - 2 又は I L - 1 5 R β に対する遮断抗体による A A の予防を示し、C 3 H / H e J 移植マウスを、移植の時点から全身的に処置したことを示した図であり、I L - 1 5 R β に対する抗体を用いて移植の時点から全身的に処置した C 3 H / H e J 移植マウスにおける A A の発生を示している。P B S - 処置マウスと比較した、I L - 1 5 R β に対する抗体を用いて処置したマウスの皮膚における C D 8 + N K G 2 D + T 細胞の頻度（ボックスの領域の上に示されている数）を示している。（* P < 0. 0 5、** P < 0. 0 1、*** p < 0. 0 0 1）

40

【図 1 2 I】I F N - γ 、I L - 2 又は I L - 1 5 R β に対する遮断抗体による A A の予防を示し、C 3 H / H e J 移植マウスを、移植の時点から全身的に処置したことを示した図であり、アイソタイプコントロール抗体を用いて、又は、I L - 1 5 R β に対する抗体を用いて処置したマウスの皮膚における C D 8 及び M H C のクラス I 及び I I の発現を示す皮膚生検の免疫組織化学染色を示している。スケールバー、1 0 0 μ m。

【図 1 3 A】全身性 J A K 1 / 2 又は J A K 3 の抑制は、移植 C 3 H / H e J マウスにおいて A A の発症を防ぐことを示した図であり、ルキソリチニブ（J A K 1 / 2 i）を用いて移植の時点から全身的に処置した C 3 H / H e J 移植マウスにおける A A の発生を示し

50

ている。(** $P < 0.01$)。処置中止から更なる12週間後の毛の再生も示されている。スケールバー、 $100\mu\text{m}$ 。

【図13B】全身性JAK1/2又はJAK3の抑制は、移植C3H/HeJマウスにおいてAAの発症を防ぐことを示した図であり、ルキシソリチニブ(JAK1/2i)を用いて移植の時点から全身的に処置したC3H/HeJ移植マウスにおけるAAの発生を示している。(** $P < 0.01$)

【図13C】全身性JAK1/2又はJAK3の抑制は、移植C3H/HeJマウスにおいてAAの発症を防ぐことを示した図であり、PBSを用いて、又は、JAK1/2iを用いて処置したマウスの皮膚及び皮膚リンパ節におけるCD8+NKG2D+T細胞の頻度(ボックスの領域の上に示されている数)を示している。(*** $p < 0.001$)

【図13D】全身性JAK1/2又はJAK3の抑制は、移植C3H/HeJマウスにおいてAAの発症を防ぐことを示した図であり、PBSを用いて、又は、JAK1/2iを用いて処置したマウスの皮膚におけるCD8及びMHCのクラスI及びIIの発現を示す皮膚生検の免疫組織化学染色を示している。

【図13E】全身性JAK1/2又はJAK3の抑制は、移植C3H/HeJマウスにおいてAAの発症を防ぐことを示した図であり、log2平均発現Zスコアとして与えられた、PBSを用いて、又は、JAK1/2iを用いて処置したマウス由来の転写解析のALADINスコアを示している。

【図13F】全身性JAK1/2又はJAK3の抑制は、移植C3H/HeJマウスにおいてAAの発症を防ぐことを示した図であり、トファシチニブ(JAK3i)を用いて移植の時点から全身的に処置したC3H/HeJ移植マウスにおけるAAの発生を示している。(** $P < 0.01$)。処置中止から更なる12週間後の毛の再生も示されている。スケールバー、 $100\mu\text{m}$ 。

【図13G】全身性JAK1/2又はJAK3の抑制は、移植C3H/HeJマウスにおいてAAの発症を防ぐことを示した図であり、トファシチニブ(JAK3i)を用いて移植の時点から全身的に処置したC3H/HeJ移植マウスにおけるAAの発生を示している。(** $P < 0.01$)

【図13H】全身性JAK1/2又はJAK3の抑制は、移植C3H/HeJマウスにおいてAAの発症を防ぐことを示した図であり、PBSを用いて、又は、JAK3iを用いて処置したマウスの皮膚及び皮膚リンパ節におけるCD8+NKG2D+T細胞の頻度(ボックスの領域の上に示されている数)を示している。(*** $p < 0.001$)

【図13I】全身性JAK1/2又はJAK3の抑制は、移植C3H/HeJマウスにおいてAAの発症を防ぐことを示した図であり、PBSを用いて、又は、JAK3iを用いて処置したマウスの皮膚におけるCD8及びMHCのクラスI及びIIの発現を示す皮膚生検の免疫組織化学染色を示している。

【図13J】全身性JAK1/2又はJAK3の抑制は、移植C3H/HeJマウスにおいてAAの発症を防ぐことを示した図であり、log2平均発現Zスコアとして与えられた、PBSを用いて、又は、JAK3iを用いて処置したマウス由来の転写解析のALADINスコアを示している。

【図14A】下流のエフェクターキナーゼJAK1/2又はJAK3の局所的な小分子インヒビターを用いた確立されたAAの回復、及び、AAを有する患者の臨床結果を示した図であり、12週間にわたる連日の投与によって0.5%JAK1/2i(中央)、0.5%JAK3i(下)又は溶媒のみ(Aquaphor、上)で背部を局所的に処置した、長期にわたり(移植後少なくとも12週)AAを有する1つの群あたり3匹のマウスを示している。この実験を3回繰り返した。処置中止後更なる8週間の毛の再生も示されている。

【図14B】下流のエフェクターキナーゼJAK1/2又はJAK3の局所的な小分子インヒビターを用いた確立されたAAの回復、及び、AAを有する患者の臨床結果を示した図であり、処置後の週として示されている育毛指数の時間経過を示している。

【図14C】下流のエフェクターキナーゼJAK1/2又はJAK3の局所的な小分子イ

10

20

30

40

50

ンヒビターを用いた確立されたA Aの回復、及び、A Aを有する患者の臨床結果を示した図であり、溶媒コントロールマウスと比較した、J A K 1 / 2 i 又はJ A K 3 i を用いて処置したマウスの皮膚におけるC D 8 + N K G 2 D + T 細胞の頻度（ボックスの領域の上に示されている数）を示している（平均± s . e . m . 、1つの群あたりn = 3、* P < 0 . 0 5、** P < 0 . 0 1）。N S、有意ではない。

【図1 4 D】下流のエフェクターキナーゼJ A K 1 / 2 又はJ A K 3 の局所的な小分子インヒビターを用いた確立されたA Aの回復、及び、A Aを有する患者の臨床結果を示した図であり、A L A D I Nスコアは、l o g 2 平均発現Z スコアとして与えられるC T L 及びI F Nシグニチャの処置関連の減少を示している。

【図1 4 E】下流のエフェクターキナーゼJ A K 1 / 2 又はJ A K 3 の局所的な小分子インヒビターを用いた確立されたA Aの回復、及び、A Aを有する患者の臨床結果を示した図であり、マウスの皮膚生検の免疫組織化学染色が、C D 8 及びM H C のクラスI 及びI I のマーカーの発現の処置関連の減少を示している。スケールバー、1 0 0 μ m。

【図1 4 F】下流のエフェクターキナーゼJ A K 1 / 2 又はJ A K 3 の局所的な小分子インヒビターを用いた確立されたA Aの回復、及び、A Aを有する患者の臨床結果を示した図であり、ルキソリチニブを用いた、ベースラインにて頭皮のうち> 8 0 %の脱毛を有したA Aを有する患者3の処置、及び、経口処置の1 2 週間後の毛の再生を示している。

【図1 4 G】下流のエフェクターキナーゼJ A K 1 / 2 又はJ A K 3 の局所的な小分子インヒビターを用いた確立されたA Aの回復、及び、A Aを有する患者の臨床結果を示した図であり、患者2の処置前（ベースライン）、及び、処置の1 2 週間後に得られた生検の臨床的相関性研究を示しており、C D 4、C D 8 及びヒト白血球抗原（H L A）のクラスI（A、B、C）及びクラスI I（D P、D Q、D R）に対する免疫染色を含んでいる。スケールバー、2 0 0 μ m。

【図1 4 H】下流のエフェクターキナーゼJ A K 1 / 2 又はJ A K 3 の局所的な小分子インヒビターを用いた確立されたA Aの回復、及び、A Aを有する患者の臨床結果を示した図であり、ヒートマップとして提示されたA Aを有する処置した患者1 及び2 由来のR N A マイクロアレイ解析（処置前対処置後対3の正常な対象）を示している。K R T、毛包ケラチン。

【図1 4 I】下流のエフェクターキナーゼJ A K 1 / 2 又はJ A K 3 の局所的な小分子インヒビターを用いた確立されたA Aの回復、及び、A Aを有する患者の臨床結果を示した図であり、累積A L A D I N指数として提示されたA Aを有する処置した患者1 及び2 由来のR N A マイクロアレイ解析（処置前対処置後対3の正常な対象）を示している。K R T、毛包ケラチン。

【図1 5】トファシチニブで処置したA A患者由来の頭皮皮膚生検サンプルの血清C X C L 1 0 の臨床写真及びA L A D I Nプロファイルを示した図である。上のパネルでは、1 6 週間の1 日2 回のトファシチニブ5 m g を用いた処置にわたって、後側の頭皮の写真を得た。左下のパネルでは、血液及び頭皮の皮膚サンプルを、ベースライン及びトファシチニブを用いた処置の4 週間後に採取した。C X C L 1 0 E L I S Aを行った。中央下のパネルでは、健常コントロール患者（正常）から、及び、ベースライン（T 0）及び処置の4 週間後（T 4）にてA A患者から採取した頭皮の皮膚サンプルからのA L A D I N遺伝子のヒートマップが示されている。右下のパネルでは、健常コントロール患者（黒）から、及び、ベースライン（赤色）及び処置の4 週間後（黄色）にてA A患者から採取した頭皮の皮膚サンプルのA L A D I Nプロットが示されている。

【図1 6】経口トファシチニブ処置の中断後の脱毛の再発を示した図である。左のパネルでは、処置の中断後8 週間の状態が示されており、最小限の脱毛が認められ得る。右のパネルでは、処置の中断後1 6 週間の状態が示されており、患者は、頭皮のほぼ完全な脱毛を示した。

【図1 7】経口トファシチニブを用いて処置した円形脱毛症患者由来の頭皮の生検標本を示した図であり、ベースライン（左のパネル）及びトファシチニブを用いた処置の4 週間後（右のパネル）でのH & E 染色された頭皮の生検切片が示されている。

【図 18-1】ルキソリチニブ処置中及び中止後の毛髪の再生を示した図である。上のパネルでは、ルキソリチニブ処置中及び中断後の個人の患者に対する SALT スコアが示されている。中央のパネルでは、ルキソリチニブ処置中及び中断後の個人の患者に対するパーセント再生が示されている。下のパネルでは、回帰モデルからの予測された患者再生軌道（黒色の線）及び実際の患者再生軌道（青色の線）が示されている。

【図 18-2】ルキソリチニブ処置中及び中止後の毛髪の再生を示した図である。上のパネルでは、ルキソリチニブ処置中及び中断後の個人の患者に対する SALT スコアが示されている。中央のパネルでは、ルキソリチニブ処置中及び中断後の個人の患者に対するパーセント再生が示されている。下のパネルでは、回帰モデルからの予測された患者再生軌道（黒色の線）及び実際の患者再生軌道（青色の線）が示されている。

【図 19】ルキソリチニブに対するレスポナー A A 患者の臨床写真を示した図であり、各対の左のパネルはベースラインにて得られた写真であり、右のパネルはルキソリチニブを用いた処置の終わりにて得られた写真である。

【図 20 A】皮膚遺伝子発現に基づくバイオマーカーが臨床応答と相関することを示した図であり、ベースラインレスポナーのサンプル及び健常コントロールサンプル間の発現差異がある遺伝子を使用した、ベースライン、処置の 12 週での患者由来のサンプル、及び、健常コントロール由来のサンプルのヒートマップ及びクラスタリング樹状図を示している。

【図 20 B】皮膚遺伝子発現に基づくバイオマーカーが臨床応答と相関することを示した図であり、処置後 12 週及びベースラインにて対象者から採取したサンプルの主成分プロットを示している。

【図 20 C】皮膚遺伝子発現に基づくバイオマーカーが臨床応答と相関することを示した図であり、A L A D I N 遺伝子のヒートマップを示している。

【図 20 D】皮膚遺伝子発現に基づくバイオマーカーが臨床応答と相関することを示した図であり、A L A D I N シグニチャの 3 次元プロットを示している。黒色、正常な対象者；赤色、ベースラインでの A A レスポナー患者；紫色、12 週間の処置後の A A 患者；黄色、ベースラインでの A A ノンレスポナー患者；青色、12 週間の処置後の A A ノンレスポナー患者。

【図 20 E】皮膚遺伝子発現に基づくバイオマーカーが臨床応答と相関することを示した図であり、A L A D I N 成分シグニチャスコアを示している。左のパネルでは、C T L シグニチャスコア；中央のパネルでは、I F N シグニチャスコア；右のパネルでは、K R T シグニチャスコア；が示されている。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 。

【図 21】ベースライン、処置の終わり、及び、処置終了後の観察の終わりでの選択された患者の臨床写真を示した図である。A、D、G、ベースラインの写真。B、E、H、処置の終わり。C、F、I、観察の終わり。

【図 22】レスポナーにおける処置で正規化された A L A D I N シグニチャを示した図である。A A 患者の皮膚サンプル由来の A L A D I N 成分スコアを、ベースライン、12 週目、及び、特定の症例においては、中間又は処置後の時点にて決定した。青色、レスポナー患者；赤色、ノンレスポナー患者；黒色、正常コントロール（NC）の患者。

【図 23】ノンレスポナー患者を示した図である。A、C、E、ベースラインの写真。B、D、F、処置の終わりの写真。

【図 24 A】遺伝子発現解析が混合性の組織遺伝子シグニチャを同定することを示した図であり、A A G S を使用した、A A P、A T / A U 及び未罹患コントロール（正常）のコホートの教師なしの階層的クラスタリングを示している（青色、過小発現、及び、赤色、過剰発現）。

【図 24 B】遺伝子発現解析が混合性の組織遺伝子シグニチャを同定することを示した図であり、遺伝子クラスタを示す遺伝子共通類似性マトリックスを示している。オレンジ色が強いほど、遺伝子発現における相違度が低いことを示している。A A において過剰及び過少発現したクラスタが示されている。

10

20

30

40

50

【図 2 4 C】遺伝子発現解析が混合性の組織遺伝子シグニチャを同定することを示した図であり、シグニチャにおける遺伝子及びそれに関連する統計的に濃縮された機能的カテゴリーのグラフ表示が示されている。青色はシグナル伝達経路を示し；黄色は免疫／炎症経路を示し；オレンジ色はHLAを示し；さらに、赤色は細胞死経路を示している。FDR補正された $p < 0.05$ での経路を、この解析のために維持した。

【図 2 5 A】MRとしてのIKZF1及びDLX4の同定を示した図であり、浸潤組織（免疫細胞）において発現した遺伝子から、終末器官（end organ）（皮膚）において発現した遺伝子の制御因子の畳み込みを解く（デコンヴォリューションする）ために使用されるパイプラインの全体的な流れを示している。複雑な一次組織サンプルから測定された遺伝子（A～Fでラベルされた藍緑色のノード）が、皮膚ネットワークにおける制御因子（R）にマップされ得るかどうかに基づき終末器官（赤色、AAGS）又は浸潤物（青色）に割り当てられている。赤色のノードにマップされた遺伝子のみが、MR分析のために考慮される。青色のノードにマップされた遺伝子は剪定される。

【図 2 5 B】MRとしてのIKZF1及びDLX4の同定を示した図であり、浸潤組織（免疫細胞）において発現した遺伝子から、終末器官（end organ）（皮膚）において発現した遺伝子の制御因子の畳み込みを解くために使用されるパイプラインの全体的な流れを示している。結果として生じるAAGSの剪定は、AAにおいて過剰発現される（クラスタ1、倍率変化に比例するノードサイズ）、及び、抑制される（クラスタ2）、IGSと相互に排他的である終末器官に富む遺伝子発現シグニチャ（藍緑色のノード）を提供している、 $p = 1.77 \times 10^{-4}$ 。

【図 2 5 C-1】MRとしてのIKZF1及びDLX4の同定を示した図であり、浸潤組織（免疫細胞）において発現した遺伝子から、終末器官（end organ）（皮膚）において発現した遺伝子の制御因子の畳み込みを解くために使用されるパイプラインの全体的な流れを示している。頭皮の皮膚制御因子の畳み込みを解くために、AAGS及びIGSに対してMR分析を行い、各シグニチャの候補制御因子を得た。皮膚における真のMR（R2）は、AAGSを使用した場合にのみ現れ、IGSにおいては現れない。浸潤制御因子（R1）は、AAGSを使用して検出されることはない。IKZF1及びDLX4は、AAGSを使用した場合にのみ有意なFDR値を有し、IGSを使用した場合には有意ではない（ $FDR = 1$ ）（左）。この分析は、皮膚においてAAGS（藍緑色の四角）及びMR（黄色の四角）としてIKZF1及びDLX4を確立している（右）。

【図 2 5 C-2】MRとしてのIKZF1及びDLX4の同定を示した図であり、浸潤組織（免疫細胞）において発現した遺伝子から、終末器官（end organ）（皮膚）において発現した遺伝子の制御因子の畳み込みを解くために使用されるパイプラインの全体的な流れを示している。頭皮の皮膚制御因子の畳み込みを解くために、AAGS及びIGSに対してMR分析を行い、各シグニチャの候補制御因子を得た。皮膚における真のMR（R2）は、AAGSを使用した場合にのみ現れ、IGSにおいては現れない。浸潤制御因子（R1）は、AAGSを使用して検出されることはない。IKZF1及びDLX4は、AAGSを使用した場合にのみ有意なFDR値を有し、IGSを使用した場合には有意ではない（ $FDR = 1$ ）（左）。この分析は、皮膚においてAAGS（藍緑色の四角）及びMR（黄色の四角）としてIKZF1及びDLX4を確立している（右）。

【図 2 6 A】IKZF1及びDLX4の外因性発現が、コンテキストに依存しないAA様遺伝子発現シグニチャを誘導することを示した図であり、IKZF1、DLX4を発現するプラスミドベクター、又は、DNA結合ドメインを欠くアイソフォームであるIKZF δ 及びRFPを発現するコントロールで遺伝子導入したhuDP及びHKにおいて測定された遺伝子発現の2D階層的クラスタリングを示している。各実験に対する処置タイプ及び細胞タイプは、ヒートマップの上部に示されている。青色は減少した発現を示し、赤色は過剰発現を示している。

【図 2 6 B】IKZF1及びDLX4の外因性発現が、コンテキストに依存しないAA様遺伝子発現シグニチャを誘導することを示した図であり、平均 $\pm$ SEMとして表され、B-アクチンに対して正規化された、四通りの遺伝子導入された細胞におけるIKZF1及

10

20

30

40

50

びDLX4 mRNAの発現の分析を示している。

【図26C】IKZF1及びDLX4の外因性発現が、コンテキストに依存しないAA様遺伝子発現シグニチャを誘導することを示した図であり、IKZF1及びDLX4タンパク質を確認するウェスタンブロットを示している。

【図26D】IKZF1及びDLX4の外因性発現が、コンテキストに依存しないAA様遺伝子発現シグニチャを誘導することを示した図であり、IKZF1過剰発現後のAAGSの発現差異によって評価されるAA様応答の特異性を測定するGSEAプロットが示されている。遺伝子が、x軸上で、最も発現差異のあるものから最も発現差異のないものまで、左から右にランク付けされており、バーコードが、IKZF1シグニチャ遺伝子の位置を表している。エンリッチメントスコア(ES)がプロット内に示されており、正規化されたエンリッチメントスコア(nES)が上部に表示されている。nESは、プロットの「最先端」でのES、すなわち、得られた最初の最大ESピークから得られる。p値が、無作為の帰無分布に対して比較されたnESに対して計算されている。

【図26E】IKZF1及びDLX4の外因性発現が、コンテキストに依存しないAA様遺伝子発現シグニチャを誘導することを示した図であり、DLX4過剰発現後のAAGSの発現差異によって評価されるAA様応答の特異性を測定するGSEAプロットが示されている。遺伝子が、x軸上で、最も発現差異のあるものから最も発現差異のないものまで、左から右にランク付けされており、バーコードが、DLX4シグニチャ遺伝子の位置を表している。エンリッチメントスコア(ES)がプロット内に示されており、正規化されたエンリッチメントスコア(nES)が上部に表示されている。nESは、プロットの「最先端」でのES、すなわち、得られた最初の最大ESピークから得られる。p値が、無作為の帰無分布に対して比較されたnESに対して計算されている。

【図27】IKZF1及びDLX4の外因性発現が、3つの培養細胞タイプにおけるNKGD依存性PBMCM関連細胞傷害の増加を誘導することを示した図である。各列の左側の概略図は、(三通りの)細胞傷害性アッセイのためにPBMCMに導入される組織を記載している。色は宿主源を示している(一致する色は、宿主が一致する組織を示している)。中央の棒グラフは、6時間のインキュベーション後に得られた細胞傷害値(全てのバーの高さ)、又は、ヒト抗NKGDモノクローナル抗体を添加して6時間後に観察された細胞傷害値(灰色のバー)を表している。NKGD依存性細胞傷害性は、それら2つの差(白いバー)である。右側の棒グラフは、RFPコントロールに対して正規化されたNKGD依存性細胞傷害性における変化を報告している。IKZF1.2BはIKZF1δベクターで遺伝子導入した細胞を示し、IKZF1.3Bは完全長の転写物を示している。y軸は、最大細胞傷害性(全細胞数)の割合として測定された細胞傷害性を報告している。全てのエラーバーは±SEMを報告している。**は、FDR<0.05でのRFPコントロールとの統計的有意差を示している。(A)WB215J PBMCM及びWB215J線維芽細胞に対応するデータ系列を示した図である。(B)培養されるhuDPに対するWB215J PBMCMを示した図である。(C)培養されるHKに対するWB215J PBMCMを示した図である。

【図28A】完全に再構築された主要制御因子モジュールが、免疫浸潤も重症度も予測することを示した図であり、外因性発現データを使用して、直接転写型MR→T(MR→T)も、MRのTであるTFによって制御されるT(MR→TF→T)も推測することが可能である。MRs IKZF1又はDLX4(TFA)と対になり、TFAの過剰発現の際に発現における変化を示すいかなるTF(TFB)も、TFAによって制御される。その後、TFBに連結されるAAGSにおけるいかなる遺伝子(T)も、(TFBが応答する)TFAの二次Tである。TFAの遺伝子導入に応答しないいかなるTFBも、TFAによって制御されないため、TFBがTFAを制御する(TFB安定、左)又はその両方が第3のTFCによって同時制御される(TFB安定、右)。

【図28B】完全に再構築された主要制御因子モジュールが、免疫浸潤も重症度も予測することを示した図であり、上記の手法を使用して、AAGSの78%を1つの間接的なTFB内のIKZF1又はDLX4にマップすることができる。青色のノードは、IKZF

10

20

30

40

50

1又はDLX4の発現に応答するAAGS遺伝子を表し、ノードのサイズは、実験的に観察された倍率変化にスケール調整されている（少なくとも25%の変化を有するノードのみが示されている）。

【図28C】完全に再構築された主要制御因子モジュールが、免疫浸潤も重症度も予測することを示した図であり、上記のTを使用して、IKZF1及びDLX4転写活性の単一の数値スコアを生成し、AA重症度に対する分類子を作成するために使用した。次いで、AAサンプルは、検索空間に課せられ、精度が評価される（上の図）。表には、検索空間内の領域にわたる提示を分離するための定量化及び統計が提供されている（未罹患：NC；斑状のAA：AAP；及び、全頭脱毛症／全身脱毛症：AT／AU）。重心表示は、訓練された境界を横切って移動することによって、どのようにして母集団が疾患状態に移行するかを示すために使用することができる（下の図；非病変：AAP-N、及び、病変：AAP-L）。

【図29A】畳み込みを解かれた制御モジュールを、同じナイーブフレームワークを使用してAA、Ps及びADに対して生成することができることを示した図であり、Ps及びADに対する疾患関連遺伝子発現シグニチャは、発現差異によって明確に定めることができる。これらのシグニチャとAA遺伝子シグニチャとの比較は、AAシグニチャがPsシグニチャとADシグニチャの両方とは統計的に異なることを明らかにしており（フィッシャーの正確確率検定）、PsシグニチャとADシグニチャとのいくつかの共有に関する統計的証拠がある。

【図29B】畳み込みを解かれた制御モジュールを、同じナイーブフレームワークを使用してAA、Ps及びADに対して生成することができることを示した図であり、上記のシグニチャを制御モジュールに変換することは、AAと比較して、AD及びPsを支配する全く異なるMRを明らかにしている。黄色のノード＝AA遺伝子シグニチャ；青色のノード＝AD遺伝子シグニチャ；藍緑色のノード＝Ps遺伝子シグニチャ；オレンジ色のノード＝AA MR；濃青色のノード＝AD MR；及び、シアン色のノード＝Ps MRである。上位5つのAD及びPs MRのリストが提供され、対応するシグニチャのカバレッジによってランク付けされている。また、畳み込みが解かれていない各MRのp値（IGS p値）も提供されている（＊は公開された制御因子を示し、†はAD及びPsに共通のMRを示している）。

【図30-1】図24のAAGSにおける濃縮された経路を示した図である。追加のIngenuity Pathway Analysisが、AAGS内の浸潤集団及び終末器官のプロセスの両方に対する免疫及び細胞傷害シグナル伝達カスケードの濃縮を示している。MRによって制御される発現差異がある遺伝子には、多くの膜結合タンパク質、細胞死タンパク質及び免疫関連タンパク質が含まれる。

【図30-2】図24のAAGSにおける濃縮された経路を示した図である。追加のIngenuity Pathway Analysisが、AAGS内の浸潤集団及び終末器官のプロセスの両方に対する免疫及び細胞傷害シグナル伝達カスケードの濃縮を示している。MRによって制御される発現差異がある遺伝子には、多くの膜結合タンパク質、細胞死タンパク質及び免疫関連タンパク質が含まれる。

【図31A】図29のAD及びPsの疾患遺伝子シグニチャを示した図であり、遺伝子発現を使用した、病変及び未罹患の患者のサンプルの教師なしの階層的クラスタリングを示している。患者は、関連遺伝子発現シグニチャを使用して、乾癬において臨床提示によって見事に分離している。サンプルの樹状図が、図29において提供されているヒートマップに対する参照のためにここで提供されている。乾癬及びアトピー性皮膚炎のコホートは、未罹患コントロールから患者を明確に描写する遺伝子発現シグニチャを有している。

【図31B】図29のAD及びPsの疾患遺伝子シグニチャを示した図であり、遺伝子発現を使用した、病変及び未罹患の患者のサンプルの教師なしの階層的クラスタリングを示している。患者は、関連遺伝子発現シグニチャを使用して、アトピー性皮膚炎において臨床提示によって見事に分離している。サンプルの樹状図が、図29において提供されているヒートマップに対する参照のためにここで提供されている。乾癬及びアトピー性皮膚炎

10

20

30

40

50

のコホートは、未罹患コントロールから患者を明確に描写する遺伝子発現シグニチャを有している。

【図 3 2 A】図 2 7 の細胞傷害性アッセイを示した図であり、細胞傷害性アッセイに対する P B M C 濃度の最適化が、最適な分離を達成するための 1 0 0 : 1 の P B M C : 標的の比を同定している。

【図 3 2 B】、図 2 7 の細胞傷害性アッセイを示した図であり、細胞傷害性アッセイに対する時間窓の最適化が、最適な分離を達成するための少なくとも 6 時間という時間を同定している。

【図 3 3 - 1】本開示と関連させてバイオマーカーとして使用するための S N P のリストを描いた図である。

【図 3 3 - 2】本開示と関連させてバイオマーカーとして使用するための S N P のリストを描いた図である。

【図 3 4】本開示と関連させてバイオマーカーとして使用するための S N P のリストを描いた図である。

【図 3 5】ルキソリチニブによる A A の処置の臨床研究の設計の概要を述べた図である。

【図 3 6】図 3 5 に記載されている研究の状態の概要を述べた図である。

【図 3 7】図 3 5 に記載されている研究の結果の概要を述べた図である。

【図 3 8】図 3 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【図 3 9 - 1】図 3 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【図 3 9 - 2】図 3 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【図 4 0 - 1】図 3 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【図 4 0 - 2】図 3 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【図 4 1】図 3 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【図 4 2】図 3 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【図 4 3 - 1】図 3 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【図 4 3 - 2】図 3 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【図 4 4】図 3 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【図 4 5】トファシチニブによる A A の処置の臨床研究の設計の概要を述べた図である。

【図 4 6】図 4 5 に記載されている研究と関連させて得られた結果を描いた図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 3】

本開示の主題は、A A の改善された診断及び予後判定、並びに、上記の疾患に対する効果的な処置を可能にするバイオマーカーに関し、そのような処置に応答する患者亜集団を同定する能力を持つバイオマーカーを組み込む方法、及び、そのような処置の進展を追跡する能力を持つバイオマーカーを組み込む方法を含む。

【0 0 1 4】

A. 定義

本開示によると、「対象者」（「被検者」）又は「患者」は、ヒト又は非ヒト動物である。動物の対象者は好ましくはヒトであるけれども、本発明の化合物及び組成物は獣医学においても適用され、例えば、イヌ、ネコ、マウス及び様々な他のペット等の飼いならされた種；ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ等の家畜種；及び、非ヒト霊長類等の例えば野生又は動物園における野生動物；の処置に対して適用される。

【0 0 1 5】

本明細書において使用される場合、「処置」、「処置する」等の用語は、所望の薬理学

10

20

30

40

50

的及び／又は生理学的な効果を得ることを意味する。この効果は、疾患又はその症状を完全に又は部分的に防ぐという点から予防的であってもよく、及び／又は、疾患に対する部分的又は完全な治癒及び／又は疾患に起因し得る有害作用という点から治療的であってもよい。「処置」は、本明細書において使用される場合、対象者又は患者における疾患のいかなる処置もカバーし、さらに：（a）疾患にかかりやすいかもしれないがまだそれを有すると診断されていない対象者において疾患が発生するのを防ぐこと；（b）疾患を抑制すること、すなわち、その発達を抑止すること；及び、（c）その疾患を軽減すること、すなわち、疾患を後退させること；を含む。

【0016】

「治療的に有効な量」又は「効果的な量」は、疾患を処置するために哺乳動物又は他の対象者に投与されたときに、そのような疾患に対する処置を行うのに十分な化合物又は組成物の量を意味する。「治療的に有効な量」は、使用される化合物又は組成物、疾患及びその重症度、並びに、処置されることになる対象者の年齢、体重等に応じて変わり得る。

【0017】

「医薬組成物」及び「医薬製剤」という用語は、本明細書において使用される場合、その中に含有される有効成分の生物活性が効果的であることを許容するような形態であり、且つ、製剤が投与されるであろう患者に対して容認しがたいほどに有毒な更なる成分を含有しない組成物を意味する。

【0018】

「薬学的に許容される」という用語は、例えば「薬学的に許容されるキャリア」に関して本明細書において使用される場合、対象者に対して無毒であるという性質を意味する。医薬製剤中の薬学的に許容される成分は、無毒である有効成分以外の成分であり得る。薬学的に許容されるキャリアは、緩衝液、賦形剤、安定剤及び／又は保存剤を含み得る。

【0019】

本明細書において使用される場合、「JAKインヒビター」は、Jak1/Jak2/Jak3/Tyk2/STAT1/STAT2/STAT3/STAT4/STAT5a/STAT5b/STAT6/OSM/gp130/LIFR/OSM-R β 遺伝子、又は、Jak1/Jak2/Jak3/Tyk2/STAT1/STAT2/STAT3/STAT4/STAT5a/STAT5b/STAT6/OSM/gp130/LIFR/OSM-R β タンパク質若しくはポリペプチドと相互作用し、且つ、その活性及び／又はその発現を抑制する化合物を意味する。この化合物は、Jak1/Jak2/Jak3/Tyk2/STAT1/STAT2/STAT3/STAT4/STAT5a/STAT5b/STAT6/OSM/gp130/LIFR/OSM-R β によってコードされるタンパク質の活性又は発現を減少させることができる。特定の実施形態では、JAKインヒビターは、重水素化化合物であり得る。特定の実施形態では、重水素化化合物は、化合物上の1つ又は複数の部位での重水素化によって改変されてもよい。

【0020】

本開示のJAKインヒビターは、本明細書において開示される対応する配列によってコードされるポリペプチドに対して作られる（モノクローナル、ポリクローナル、ヒト化、キメラ又は完全ヒト型）抗体又はその結合性フラグメント等のタンパク質であり得る。抗体断片は、完全長の形態以外の抗体の形態であってもよく、操作された抗体断片に加えて、完全長の抗体内に存在する部分又は成分を含む。抗体断片は、単鎖Fv（scFv）、二重特異性抗体、Fv及び（Fab'）₂、三重特異性抗体、Fc、Fab、CDR1、CDR2、CDR3、CDRの組み合わせ、可変領域、四重特異性抗体、二機能性ハイブリッド抗体、フレームワーク領域、定常領域等を含み得るが、それらに限定されない。抗体は、当技術分野において確立された方法に従って、関心のある抗原に対して、商業的に得る、カスタム生成する又は合成することができる。

【0021】

本開示のJAKインヒビターは、タンパク質に結合し且つその機能を破壊する小分子であり得る。小分子は、一般的に低分子量を有する合成物質及び天然物質の多様な群である

10

20

30

40

50

。小分子は、天然源（例えば、植物、菌類、微生物等）から単離することができ、商業的に得られ、及び／又は、ライブラリー又はコレクションとして入手可能であるか又は合成される。タンパク質を調節する候補小分子は、コンビナトリアルライブラリーの *in silico* のスクリーニング又はハイスループット（HTP）スクリーニングを介して同定することができる。アスピリン、ペニシリン及び多くの化学療法薬等のほとんどの従来の医薬品は、小分子であり、商業的に得ることができ、化学的に合成することができ、又は、ランダム又はコンビナトリアルライブラリーから得ることができる。特定の実施形態では、作用物質は、標的タンパク質又はRNAと結合する、相互作用する又は付随する小分子である。そのような小分子は、標的が細胞内標的である場合、細胞の脂質二重層に浸透して標的と相互作用する能力を持つ有機分子であり得る。小分子には、毒素、キレート剤、金属及びメタロイド化合物が含まれるが、それらに限定されない。小分子は、小分子を特定の細胞に特異的に誘導するように、ターゲティング剤に結合させるか又は接合させることができる。

10

【0022】

特定の実施形態では、JAKインヒビターは、ルキシロチニブ（INCB 018424）、トファシチニブ（CP690550）、チロホスチンAG490（CAS Number: 133550-30-8）、モメロチニブ（CYT387）、パクリチニブ（SB1518）、バリシチニブ（LY3009104）、フェドラチニブ（TG101348）、BMS-911543（CAS Number: 1271022-90-2）、レスタウルチニブ（CEP-701）、フルダラビン、エピガロカテキン-3-ガラート（EGCG）、ペフィシチニブ、ABT494（CAS Number: 1310726-60-3）、AT9283（CAS Number: 896466-04-9）、デセルノチニブ、フィルゴチニブ、ガンドチニブ、INCB39110（CAS Number: 1334298-90-6）、PF 04965842（CAS Number: 1622902-68-4）、R348（R-932348、CAS Number: 916742-11-5; 1620142-65-5）、AZD1480（CAS Number: 935666-88-9）、セルジュラチニブ、INCB052793（Incyte、臨床試験ID: NCT02265510）、NS018（CAS Number: 1239358-86-1（遊離塩基）; 1239358-85-0（HCl））、AC410（CAS Number: 1361415-84-0（遊離塩基）、1361415-86-2（HCl））、CT1578（SB1578、CAS Number: 937273-04-6）、JTE052（Japan Tobacco Inc.）、PF6263276（Pfizer）、R548（Rigel）、TG02（SB1317、CAS Number: 937270-47-8）、ランブリカス・レベラス抽出物、ARN4079（Arriven Pharmaceuticals, LLC.）、AR13154（Aerie Pharmaceuticals Inc.）、UR67767（Palau Pharma S. A.）、CS510（Shenzhen Chipscreen Bioscience Ltd.）、VR588（Vectura Group plc）、DNX04042（Dynamix Pharmaceuticals/Clevexel）、ハイパーフォリン又はその組み合わせである。

20

30

40

【0023】

特定の実施形態では、JAKインヒビターは、Jak1、Jak2、Jak3、Tyk2、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6、OSM、gp130、LIFR又はOSM-R β をコードする遺伝子の発現を特異的に抑制するアンチセンスRNA、siRNA、shRNA、マイクロRNA又はその変異体若しくは変態である。

【0024】

B. 円形脱毛症のバイオマーカー

本開示の実施形態は、対象者における円形脱毛症（AA）を処置する方法に関する。特定の実施形態では、対象者におけるAAを処置する方法であって：疾患重症度、及び／又

50

は、上記の対象者に治療的介入を施す前、施している間及び／又は施した後の対象者の処置に応答する傾向を示すバイオマーカーを検出するステップを含む方法が開示されている。特定の実施形態では、バイオマーカーは遺伝子発現シグニチャである。特定の実施形態では、遺伝子発現シグニチャは、以下の群の遺伝子：ヘアセラチン（KRT）関連遺伝子、細胞傷害性Tリンパ球浸潤（CTL）関連遺伝子及びインターフェロン（IFN）関連遺伝子のうち1つ又は複数の群の遺伝子発現情報を含む。特定の実施形態では、KRT関連遺伝子は、DSG4、HOXC31、KRT31、KRT32、KRT33B、KRT82、PKP1及びPKP2を含む。特定の実施形態では、CTL関連遺伝子は、CD8A、GZMB、ICOS及びPRF1を含む。特定の実施形態では、IFN関連遺伝子は、CXCL9、CXCL10、CXCL11、STAT1及びMX1を含む。

10

【0025】

特定の実施形態では、遺伝子発現シグニチャは、円形脱毛症疾患活性指数（ALADIN）である。円形脱毛症疾患活性指数（ALADIN）は、疾患重症度及び処置に対する応答を追跡するためのバイオマーカーとしての潜在的な使用のための3次元定量的複合遺伝子発現スコアである。特定の実施形態では、ALADINは、CTL、IFN及びKRT関連遺伝子の遺伝子発現に基づき、CTL、IFN及びKRTのALADINスコアが、対象者の各サンプルに対して計算される。特定の実施形態では、Zスコアが、正常コントロールの平均及び標準偏差に対して、各プローブセットに対して計算される。各遺伝子に対するZスコアは、その遺伝子にマップされたプローブセットのZスコアを平均することによって得られてもよい。特定の実施形態では、次いで、シグニチャスコアが、対応するシグニチャに属する遺伝子に対するZスコアの平均で計算される。

20

【0026】

特定の実施形態では、バイオマーカーは、表Aにおいて記載された1つ又は複数の遺伝子を含む円形脱毛症遺伝子シグニチャ（AAGS）である。特定の実施形態では、バイオマーカーは、IKZF1、DLX4又はその組み合わせである。

【0027】

表A

【表 1】

表 A

NCBI GenBank ID	Official Gene Name 遺伝子公式名
T cell activation T細胞活性化	
596	B-cell CLL/lymphoma 2
914	CD2 molecule
915	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)
920	CD4 molecule
972	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
942	CD86 molecule
925	CD8a molecule
926	CD8b molecule
10320	IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)
8440	NCK adaptor protein 2
1499	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
55636	chromodomain helicase DNA binding protein 7
8320	eomesodermin homolog (Xenopus laevis)
3683	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)
3684	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
3659	interferon regulatory factor 1
3600	interleukin 15
3936	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
3932	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
3108	major histocompatibility complex, class II, DM alpha
6693	sialophorin
387357	thymocyte selection pathway associated
immune response 免疫応答	
596	B-cell CLL/lymphoma 2
29760	B-cell linker
23601	C-type lectin domain family 5, member A
929	CD14 molecule
9332	CD163 molecule
100133941	CD24 molecule; CD24 molecule-like 4
972	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
9308	CD83 molecule
8832	CD84 molecule
50848	F11 receptor
2268	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
10866	HLA complex P5
150372	NFAT activating protein with ITAM motif 1
25939	SAM domain and HD domain 1

10

20

30

40

50

50852	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1	
7078	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	
7305	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	
11326	V-set and immunoglobulin domain containing 4	
84632	actin filament associated protein 1-like 2	
90	activin A receptor, type I	
199	allograft inflammatory factor 1	10
197	alpha-2-HS-glycoprotein	
60489	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G	
80833	apolipoprotein L, 3	
650	bone morphogenetic protein 2	
9435	carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2	
1508	cathepsin B	
6357	chemokine (C-C motif) ligand 13	
6362	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	
6351	chemokine (C-C motif) ligand 4	20
6352	chemokine (C-C motif) ligand 5	
6355	chemokine (C-C motif) ligand 8	
1230	chemokine (C-C motif) receptor 1	
1234	chemokine (C-C motif) receptor 5	
3627	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	
4283	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	
4261	class II, major histocompatibility complex, transactivator	
713	complement component 1, q subcomponent, B chain	
714	complement component 1, q subcomponent, C chain	30
1755	deleted in malignant brain tumors 1	
8456	forkhead box N1	
3055	hemopoietic cell kinase	
8347, 8343, 8346, 8344, 8339	histone cluster 1, H2bi; histone cluster 1, H2bg; histone cluster 1, H2be; histone cluster 1, H2bf; histone cluster 1, H2bc	
3399	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	
3683	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)	40
3689	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	
3694	integrin, beta 6	
64135	interferon induced with helicase C domain 1	
338376	interferon, epsilon	
3600	interleukin 15	
9235	interleukin 32	
3579	interleukin 8 receptor, beta	
3822	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2	

3988	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase
58530	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6F; lymphocyte antigen 6 complex, locus G6D
3107, 3106	major histocompatibility complex, class I, C; major histocompatibility complex, class I, B
4332	myeloid cell nuclear differentiation antigen
4542	myosin IF
5551	perforin 1 (pore forming protein)
30814	phospholipase A2, group IIE
5341	pleckstrin
10544	protein C receptor, endothelial (EPCR)
5265	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1
12	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3
6614	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin
6693	sialophorin
6469	sonic hedgehog homolog (Drosophila)
7057	thrombospondin 1
7096	toll-like receptor 1
7042	transforming growth factor, beta 2
6890	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
7133	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
7534	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
plasma membrane 原形質膜	
8909	26 serine protease
417	ADP-ribosyltransferase 1
24	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4
5243	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
5244	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4
9619	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
29760	B-cell linker
598	BCL2-like 1
23601	C-type lectin domain family 5, member A
160365	C-type lectin-like 1
135228	CD109 molecule
929	CD14 molecule
9332	CD163 molecule
911	CD1c molecule
914	CD2 molecule
30835	CD209 molecule
100133941	CD24 molecule; CD24 molecule-like 4

10

20

30

40

915	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)	
920	CD4 molecule	
1043	CD52 molecule	
963	CD53 molecule	
972	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	
3732	CD82 molecule	
9308	CD83 molecule	
8832	CD84 molecule	10
942	CD86 molecule	
925	CD8a molecule	
926	CD8b molecule	
10225	CD96 molecule	
56882	CDC42 small effector 1	
30845	EH-domain containing 3	
1969	EPH receptor A2	
2048	EPH receptor B2	
50848	F11 receptor	20
22844	FERM and PDZ domain containing 1	
2205	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	
2212	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)	
2213	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32); Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32)	
166647	G protein-coupled receptor 125	
23432	G protein-coupled receptor 161	
1880	G protein-coupled receptor 183	
55507	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member D	30
3927	LIM and SH3 protein 1	
130576	LY6/PLAUR domain containing 6B	
65108	MARCKS-like 1	
3071	NCK-associated protein 1-like	
150372	NFAT activating protein with ITAM motif 1	
4864	Niemann-Pick disease, type C1	
5754	PTK7 protein tyrosine kinase 7	
376267	RAB15, member RAS oncogene family	
22931	RAB18, member RAS oncogene family	40
285613	RELT-like 2	
56963	RGM domain family, member A	
23504	RIMS binding protein 2	
10900	RUN domain containing 3A	
6016	Ras-like without CAAX 1	
51458	Rh family, C glycoprotein	
30011	SH3-domain kinase binding protein 1	

4092	SMAD family member 7	
8869	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	
6461	Src homology 2 domain containing adaptor protein B	
50852	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1	
28639	T cell receptor beta variable 19; T cell receptor beta constant 1	
6967	T cell receptor gamma locus; T cell receptor gamma constant 2	
445347	TCR gamma alternate reading frame protein; T cell receptor gamma variable 9; T cell receptor gamma constant 1	10
7305	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	
11326	V-set and immunoglobulin domain containing 4	
65266	WNK lysine deficient protein kinase 4	
10152	abl interactor 2	
90	activin A receptor, type I	
120425	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1	
199	allograft inflammatory factor 1	
83543	allograft inflammatory factor 1-like	
351	amyloid beta (A4) precursor protein	20
56899	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1B	
83464	anterior pharynx defective 1 homolog B (C. elegans)	
54796	basonuclein 2	
144453	bestrophin 3	
685	betacellulin	
1952	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, Drosophila)	
776	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	
8913	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	
27092	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	30
800	caldesmon 1	
768	carbonic anhydrase IX	
1499	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	
1500	catenin (cadherin-associated protein), delta 1	
1501	catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-related arm-repeat protein)	
1508	cathepsin B	
1230	chemokine (C-C motif) receptor 1	
1234	chemokine (C-C motif) receptor 5	40
25932	chloride intracellular channel 4	
1464	chondroitin sulfate proteoglycan 4	
23562	claudin 14	
1436	colony stimulating factor 1 receptor	
594855	complexin 3	
1525	coxsackie virus and adenovirus receptor pseudogene 2; coxsackie virus and adenovirus receptor	

26999	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2
1824	desmocollin 2
1830	desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen)
147409	desmoglein 4
55740	enabled homolog (Drosophila)
30816	endogenous retroviral family W, env(C7), member 1
1946	ephrin-A5
2099	estrogen receptor 1
2260	fibroblast growth factor receptor 1
23767	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3
54751	filamin binding LIM protein 1
2323	fms-related tyrosine kinase 3 ligand
2350	folate receptor 2 (fetal)
342184	formin 1
7976	frizzled homolog 3 (Drosophila)
8323	frizzled homolog 6 (Drosophila)
8324	frizzled homolog 7 (Drosophila)
2523	fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase, H blood group)
2554	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1
2561	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 2
2700	gap junction protein, alpha 3, 46kDa
2706	gap junction protein, beta 2, 26kDa
10804	gap junction protein, beta 6, 30kDa
125111	gap junction protein, delta 3, 31.9kDa
342035	gliomedin
2892	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3
3001	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)
3002	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
2774	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide, olfactory type
2782	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
115362	guanylate binding protein 5
64399	hedgehog interacting protein
9456	homer homolog 1 (Drosophila)
9455	homer homolog 2 (Drosophila)
3683	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)
3684	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
3687	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
3689	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
3694	integrin, beta 6
3587	interleukin 10 receptor, alpha

10

20

30

40

3594	interleukin 12 receptor, beta 1	
3600	interleukin 15	
3561	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	
3579	interleukin 8 receptor, beta	
182	jagged 1 (Alagille syndrome)	
58494	junctional adhesion molecule 2	
3821	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	
3822	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2	
22914	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	10
8549	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	
3977	leukemia inhibitory factor receptor alpha	
58530	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6F; lymphocyte antigen 6 complex, locus G6D	
3936	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	
3932	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	
4033	lymphoid-restricted membrane protein	
9170	lysophosphatidic acid receptor 2	20
23566	lysophosphatidic acid receptor 3	
3107, 3106	major histocompatibility complex, class I, C; major histocompatibility complex, class I, B	
3134	major histocompatibility complex, class I, F	
3108	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	
3109	major histocompatibility complex, class II, DM beta	
3111	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	
3113	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	
3119	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1; similar to major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	30
4118	mal, T-cell differentiation protein	
4360	mannose receptor, C type 1	
55686	melanoregulin	
154043, 9223	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1; CNKSR family member 3	
23499	microtubule-actin crosslinking factor 1	
9053	microtubule-associated protein 7	
4128	monoamine oxidase A	
4155	myelin basic protein	40
8828	neuropilin 2	
4846	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	
123264	organic solute transporter beta	
29780	parvin, beta	
64098	parvin, gamma	
5551	perforin 1 (pore forming protein)	

5141	phosphodiesterase 4A, cAMP-specific (phosphodiesterase E2 dunce homolog, <i>Drosophila</i>)
27445	piccolo (presynaptic cytomatrix protein)
5317	plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome); similar to plakophilin 1 isoform 1a
11187	plakophilin 3
5341	pleckstrin
23362	pleckstrin and Sec7 domain containing 3
5362	plexin A2
5818	poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C)
81607	poliovirus receptor-related 4
200845	potassium channel tetramerisation domain containing 6
3784	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
56937	prostate transmembrane protein, androgen induced 1
10544	protein C receptor, endothelial (EPCR)
5579	protein kinase C, beta
5587	protein kinase D1
26051	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B
5099	protocadherin 7
53829	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13
9934	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14
54509	ras homolog gene family, member F (in filopodia)
9699	regulating synaptic membrane exocytosis 2
9783	regulating synaptic membrane exocytosis 3
6248	regulatory solute carrier protein, family 1, member 1
22800	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2; similar to related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2
6404	selectin P ligand
64218	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A
6614	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin
89790	sialic acid binding Ig-like lectin 10
6693	sialophorin
140885	signal-regulatory protein alpha
55423	signal-regulatory protein gamma
6504	signaling lymphocytic activation molecule family member 1
4301	similar to Afadin (Protein AF-6); myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>); translocated to, 4
57228	small trans-membrane and glycosylated protein
6509	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4
6511	solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member 6
10723	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 7
9120	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7); similar

10

20

30

40

	to solute carrier family 16, member 6	
220963	solute carrier family 16, member 9 (monocarboxylic acid transporter 9)	
6575	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2	
28965	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6	
10991	solute carrier family 38, member 3	
30061	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	
200010	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 9	
11254	solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14	
55117	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 15	10
23428	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8	
23657	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	
6751	somatostatin receptor 1	
6752	somatostatin receptor 2	
6469	sonic hedgehog homolog (Drosophila)	
6272	sortilin 1	
124460	sorting nexin 20	
2040	stomatin	20
6854	synapsin II	
54843	synaptotagmin-like 2	
117178	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	
7057	thrombospondin 1	
6915	thromboxane A2 receptor	
7096	toll-like receptor 1	
7039	transforming growth factor, alpha	
7053	transglutaminase 3 (E polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	30
140803	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6	
4071	transmembrane 4 L six family member 1	
6890	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	
10381	tubulin, beta 3; melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor)	
8795	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	
51330	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	
7133	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	
7126	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	40
94015	tweety homolog 2 (Drosophila)	
5412	ubiquitin-like 3	
673	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	
6843	vesicle-associated membrane protein 1 (synaptobrevin 1)	
antigen presentation 抗原提示		
920	CD4 molecule	
972	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	

925	CD8a molecule	
926	CD8b molecule	
1508	cathepsin B	
1520	cathepsin S	
4261	class II, major histocompatibility complex, transactivator	
3306	heat shock 70kDa protein 2	
3821	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	
3822	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2	
3107, 3106	major histocompatibility complex, class I, C; major histocompatibility complex, class I, B	10
3134	major histocompatibility complex, class I, F	
3108	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	
3109	major histocompatibility complex, class II, DM beta	
3111	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	
3113	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	
3119	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1; similar to major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	20
2923	protein disulfide isomerase family A, member 3	
5993	regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression)	
6890	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	
hair cycle/hair follicle dev/epidermis dev 毛周期/毛包dev/表皮dev		
596	B-cell CLL/lymphoma 2	
8538	BARX homeobox 2	
2001	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)	
646	basonuclin 1	
1499	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	30
1474	cystatin E/M	
2068	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2	
2171	fatty acid binding protein 5-like 2; fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated); fatty acid binding protein 5-like 8; fatty acid binding protein 5-like 7; fatty acid binding protein 5-like 9	
2304	forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	
8456	forkhead box N1	
3229	homeobox C13	
182	jagged 1 (Alagille syndrome)	40
3868	keratin 16; keratin type 16-like	
342574	keratin 27	
3881	keratin 31	
3882	keratin 32	
3885	keratin 34	
3854	keratin 6B	
3889	keratin 83	

3891	keratin 85
3846	keratin associated protein 5-9
51176	lymphoid enhancer-binding factor 1
55686	melanoregulin
5017	ovo-like 1(Drosophila)
864	runt-related transcription factor 3
6469	sonic hedgehog homolog (Drosophila)
7042	transforming growth factor, beta 2
7053	transglutaminase 3 (E polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)

10

【0028】

C. バイオマーカー検出

本開示の方法において使用されるバイオマーカーは、当該技術で公知のいずれの方法を用いて生物学的サンプル中で同定され得る。バイオマーカー、タンパク質もしくはその分解生成物の存在、mRNAもしくはプレmRNAの存在、又はバイオマーカーの発現を示すいずれの生体分子もしくは生成物の存在、又はその分解生成物を決定することは、本明細書に記載されるか、又は当該技術で公知のいずれの方法における使用のために実施することができる。

20

【0029】

核酸検出技術

核酸バイオマーカーを定性的又は定量的に検出するためのいずれの方法を使用することができる。例えば、RNA転写物の検出は、例えばノーザンブロッティングによって行うことができる。ここで、RNAの調製物を変性アガロースゲル上で泳動させ、そして活性化セルロース、ニトロセルロース又はガラス又はナイロン膜などの適切な支持体に転写する。次いで、放射標識したcDNA又はRNAを前記調製物にハイブリダイズさせ、洗浄し、オートラジオグラフィーによって分析する。

30

【0030】

RNA転写物の検出は、増幅方法を用いてさらに達成することができる。例えば、mRNAをcDNAに逆転写した後にポリメラーゼ連鎖反応を行うこと(RT-PCR)、又は米国特許第5,322,770号に記載されるように両方の工程のために単一の酵素を使用すること、又はR. L. Marshall, et al., PCR Methods and Applications 4: 80-84 (1994)に記載されるようにmRNAをcDNAに逆転写した後に対称ギャップリガーゼ連鎖反応を行うこと(RT-AGLCR)は、本開示の範囲内である。

【0031】

特定の実施形態において、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)を用いて、バイオマーカーのmRNAレベルを評価する。バイオマーカー及びコントロールmRNAのレベルは、患部組織もしくは細胞及び隣接する罹患していない組織において定量することができる。1つの特定の実施形態において、生体サンプル中の1つ以上のバイオマーカーのレベルを定量することができる。

40

【0032】

本明細書で利用することができる他の既知の増幅方法は、PNAS USA 87: 1874-1878 (1990)に記載され、且つNature 350 (No. 6313): 91-92 (1991)にも記載される、いわゆる「NASBA」又は「3SR」技術；欧州特許出願公開(EPA)第4544610号に記載されているQ-

50

ベータ増幅；G. T. Walker et al., Clin. Chem. 42: 9-13 (1996) 及び欧州特許出願第684315号に記載されている鎖置換増幅；及びPCT公開WO9322461に記載されているような標的媒介増幅；を包含するが、これらに限定されない。

【0033】

in situハイブリダイゼーションの視覚化も利用することができる。ここで、放射性標識されたアンチセンスRNAプローブは、生検サンプルの薄切片とハイブリダイズされ、洗浄され、RNAアーゼで切断され、オートラジオグラフィーのための感光乳剤(sensitive emulsion)に曝露される。サンプルは、当該サンプルの組織学的組成を証明するためにヘマトキシリンで染色することができ、好適な光フィルターによる暗視野イメージングは、現像された感光乳剤(emulsion)を示す。ジゴキシゲニンなどの非放射性標識も使用することができる。

10

【0034】

バイオマーカー発現の評価のための別の方法は、蛍光in situハイブリダイゼーション(fluorescent in situ hybridization, FISH)によってバイオマーカーのmRNAレベルを検出することである。FISHは、細胞中のDNA又はRNAの特定の領域を直接的に同定することができる技術であり、及び従って、組織サンプル中のバイオマーカー発現の視覚的決定を可能にする。FISH法は、より客観的なスコアリングシステムと、同じサンプル中の全ての非新生物細胞に存在するバイオマーカー遺伝子シグナルからなる組み込み(built-in)インターナルコントロールの存在と、の利点を有する。蛍光in situハイブリダイゼーションは、比較的迅速かつ敏感である直接in situ技術である。FISHテストも自動化できる。免疫組織化学単独でバイオマーカーの発現レベルを決定することが困難な場合、免疫組織化学をFISH法と組み合わせることができる。

20

【0035】

あるいは、mRNA発現は、DNAアレイ、チップ又はマイクロアレイ上で検出することができる。バイオマーカー(複数可)に対応するオリゴヌクレオチドはチップ上に固定化され、次いで、対象者(a subject)から得られたテストサンプルの標識核酸とハイブリダイズされる。ポジティブハイブリダイゼーションシグナルは、バイオマーカー転写物を含むサンプルで得られる。DNAアレイを調製する方法及びその使用は、当技術で周知である(例えば、米国特許第6,618,679号、第6,379,897号、第6,664,377号、第6,451,536号、第548,257号、米国特許第20030157485号及びSchena et al. 1995 Science 20: 467-470; Gerhold et al. 1999 Trends in Biochem. Sci. 24, 168-173; and Lennon et al. 2000 Drug discovery Today 5: 59-65を参照。これらはその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。遺伝子発現の逐次連続分析(Serial Analysis of Gene Expression, SAGE)も行うことができる(例えば、US米国特許出願第20030215858号を参照)。

30

【0036】

mRNAレベルをモニターするために、例えば、試験すべき生体サンプルからmRNAを抽出することができ、逆転写され、及び蛍光標識したcDNAプローブが生成される。マイクロアレイは、バイオマーカーにハイブリダイズすることができる。次いでcDNAを標識されたcDNAプローブでプローブすることができ、スライドをスキャンし、及び蛍光強度を測定する。この強度は、ハイブリダイゼーション強度及び発現レベルと関連する。

40

【0037】

RNAの検出のためのプローブのタイプは、cDNA、リボプローブ、合成オリゴヌクレオチド及びゲノムプローブを包含する。使用されるプローブのタイプは、一般に、特定の状況、例えばin situハイブリダイゼーションのためのリボプローブ及びノーザ

50

ンブロットイングのための cDNA、によって決定づけられよう(dictated)。特定の実施形態において、プローブは、特定のバイオマーカーRNAにユニークなヌクレオチド領域に向けられる。プローブは、特定のバイオマーカーmRNA転写物を示差的に認識するために必要とされるように短くてもよく、且つ、例えば、15塩基ほど短くてもよい。しかし、少なくとも17塩基、少なくとも18塩基及び少なくとも20塩基のプローブを使用することができる。特定の実施形態において、プライマー及びプローブは、標的遺伝子に対応するヌクレオチド配列を有する核酸フラグメントにストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズする。本明細書で使用されるように、「ストリンジェントな条件」という用語は、配列間に少なくとも95%又は少なくとも97%の同一性(identity)がある場合にのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。

10

【0038】

プローブの標識の形態は、放射性同位体の使用のような適切であるいずれか、例えば³²P及び³⁵Sなど、であり得る。放射性同位元素による標識は、プローブが化学的に又は生物学的に合成されようと、好適に標識された塩基の使用により達成することができる。

【0039】

タンパク質検出技術

タンパク質バイオマーカーの検出のための方法は、当業者に周知であり、且つ、質量分析技術、1-Dもしくは2-Dゲルベースの分析システム、クロマトグラフィー、酵素結合免疫吸着アッセイ(enzyme linked immunosorbent assays, ELISAs)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素イムノアッセイ(EIA)、ウェスタンブロットイング、免疫沈降及び免疫組織化学を包含するが、これらに限定されない。これらの方法は、タンパク質を検出するために抗体もしくは抗体等価物を使用するか、又は生物物理学的技術を使用する。抗体アレイ又はタンパク質チップも使用することができる(例えば、米国特許出願番号2003/0013208A1; 2002/0155493A1号、2003/0017515号及び米国特許第6,329,209号及び第6,365,418号を参照。その全体が参照により本明細書に組み入れられる。)

20

【0040】

ELISA及びRIA手順は、バイオマーカー標準を標識するように行うことができる(¹²⁵Iもしくは³⁵Sなどの放射性同位元素、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼなどのアッセイ可能な酵素を用いて)、且つ、標識されていないサンプルと共に、対応する抗体と接触させることができ、その際、第2の抗体を用いて第1の抗体に結合させ、及び放射能もしくは固定化酵素をアッセイする(競合アッセイ)。あるいは、サンプル中のバイオマーカーに対応する固定化抗体と反応させ、放射性同位体又は酵素標識抗バイオマーカー抗体を系と反応させ、及び放射能又は酵素をアッセイする(ELISA-サンドイッチアッセイ)。他の従来の方法も好適に使用することができる。

30

【0041】

上記の技術は、本質的に「1ステップ」又は「2ステップ」アッセイとして実施することができる。「1ステップ」アッセイは、抗原を固定化抗体と接触させ、洗浄することなく、混合物を標識抗体と接触させることを含む。「2ステップアッセイは、混合物を標識抗体と接触させる前に洗浄することを含む。他の従来の方法も好適に使用することができる。

40

【0042】

特定の実施形態において、バイオマーカー発現を測定する方法は、以下のステップ:

生体サンプル、例えば血液及び/又は血漿を、前記バイオマーカーに選択的に結合する抗体又はその変異体(例えば、フラグメント)と接触させるステップと、

前記抗体又はその変異体が前記サンプルに結合しているかどうかを検出するステップと、

を包含する。方法は、前記サンプルを第2の抗体、例えば標識された抗体と接触させるこ

50

とをさらに含むことができる。当該方法は、例えば 1 以上の試薬を除去するため、1 以上の洗浄ステップをさらに包含することができる。

【0043】

分析システムの 1 成分を支持体上に固定化し、それにより、前記システムの他の成分を当該成分と接触させ、且つ、面倒な時間を費やす労力なしに容易に除去することができることが望ましい。第 2 の相を第 1 の相から離して (away from) 固定化することは可能であるが、通常は 1 相で十分である。

【0044】

酵素自体を支持体上に固定化することは可能であるが、固相酵素が必要な場合には、これは一般に、抗体に結合させ、及び当該技術において周知である支持体、モデル及びシステムに前記抗体を固定させることによって最も良好に達成される。単純なポリエチレンは好適な支持体を提供することができる。

【0045】

標識に用いることができる酵素は、特に限定されないが、例えば、オキシダーゼ群のメンバーから選択することができる。これらは、その基質との反応による過酸化水素の産生を触媒し、そしてグルコースオキシダーゼは、その良好な安定性、入手容易性及び安価性、ならびにその基質（グルコース）の容易な利用可能性のためにしばしば使用される。オキシダーゼの活性は、当該技術で周知の制御条件下で、酵素標識された抗体と基質との反応後に形成された過酸化水素の濃度を測定することによって、アッセイすることができる。

【0046】

本開示に基づく専門家 (practitioner) の選択に従ってバイオマーカーを検出するために、他の技術を使用することができる。バイオマーカータンパク質レベルを検出及び定量するために使用できる 1 つのこのような技術は、ウェスタンブロッティングである (Towbin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 76:4350 (1979))。細胞を凍結し、溶解緩衝液中でホモジナイズし、溶解物を SDS-PAGE、及びニトロセルロースフィルターなどの膜へのブロッティングに供することができる。次いで、抗体（標識されていない）を前記膜と接触させ、そして、二次免疫試薬、例えば標識されたプロテイン A 又は抗免疫グロブリン (^{125}I 、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼを包含する好適なラベル)、によりアッセイする。クロマトグラフィーによる検出も用いることができる。特定の実施形態において、免疫検出は、増強化学発光系（例えば、PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA から）を使用するバイオマーカーに対する抗体を用いて行うことができる。その後、前記膜をストリップし、そしてコントロール (control) 抗体、例えば Sigma (St. Louis, Mo.) からの抗アクチン (A-2066) ポリクローナル抗体で再プロットすることができる。

【0047】

例えば生検サンプル中のバイオマーカーの発現及び／又は存在を検出するために免疫組織化学を用いることができる。好適な抗体を、例えば、細胞の薄層と接触させ、続いて未結合の抗体を除去するため洗浄して、及び次いで第 2 の標識された抗体と接触させる。標識することは、蛍光マーカー、酵素、例えばペルオキシダーゼ、アビジン又は放射標識によって行うことができる。前記アッセイは、顕微鏡を用いて視覚的に評価され、そしてその結果を定量することができる。

【0048】

他の機械又は自動イメージングシステムも、バイオマーカーの免疫染色結果を測定するために使用することができる。本明細書で使用されるように、「定量的」免疫組織化学は、抗原又は他のタンパク質などの特定のバイオマーカーの存在を同定及び定量するために、免疫組織化学を受けさせたサンプルをスキャン及び評価する自動化された方法を指す。サンプルに与えられたスコアは、サンプルの免疫組織化学的染色の強度の数値表示であり、及びサンプル中に存在する標的バイオマーカーの量を表す。本明細書で使用されるよう

に、光学濃度 (Optical Density, OD) は、染色の強度を表す数値スコアである。本明細書で使用されるように、半定量的免疫組織化学は、ヒトの眼による免疫組織化学結果の評価を指し、その場合、訓練されたオペレーターは、結果を数値的にランク付けする (例えば、1、2 又は 3 として)。

【0049】

免疫組織化学での使用に好適な様々な自動サンプル処理、スキャニング及び分析システムが当該技術で利用可能である。このようなシステムには、自動染色 (例えば、Benchmark システム、Ventana Medical Systems, Inc. 参照) 及び顕微鏡走査、コンピュータ化画像解析、連続切片比較 (サンプルの向き及びサイズの変動を制御するため)、デジタル報告生成、並びにサンプルのアーカイビング及びトラッキング (例えば、組織切片が置かれたスライドなど) を包含することができる。免疫染色されたサンプルを包含する細胞及び組織について定量分析を行うため、従来の光学顕微鏡とデジタル画像処理システムとを組み合わせた細胞イメージングシステムは、市販されている。例えば、CAS-200 システム (Becton, Dickinson & Co.) を参照されたい。

【0050】

バイオマーカーに対する抗体は、画像化目的で、例えば対象者の細胞内のバイオマーカーの存在を検出するためにも使用することができる。好適な標識は、放射性同位体、ヨウ素 (^{125}I 、 ^{121}I)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、トリチウム (^3H)、インジウム (^{112}In) 及びテクネチウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) が、蛍光標識、例えばフルオレセイン及びローダミンなど、及びビオチンを包含する。免疫酵素相互作用は、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどの異なる酵素、又は DAB、AEC もしくはファストレッド (Fast Red) などの異なる色素原を使用して視覚化することができる。

【0051】

使用することができる抗体及びその誘導体には、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、キメラ、ヒト、ヒト化、霊長類化 (CDR 移植)、ベニヤ化 (veneered) もしくは一本鎖抗体、相生成抗体 (例えば、ファージディスプレイライブラリー由来)、ならびに抗体の機能的結合フラグメントを包含する。例えば、Fv、Fab、Fab' 及び F(ab')₂ フラグメントを包含するが、これに限定されない、バイオマーカーに結合することができる抗体フラグメント、又はその一部を使用することができる。そのようなフラグメントは、酵素的切断又は組換え技術によって産生され得る。例えば、パパイン又はペプシン切断は、それぞれ Fab 又は F(ab')₂ フラグメントを生成し得る。Fab 又は F(ab')₂ フラグメントを生成するため、必要な基質特異性を有する他のプロテアーゼを使用することもできる。抗体はまた、1 以上の終止コドンが天然の終止部位の上流に導入された抗体遺伝子を使用して、様々な切断 (truncated) 形態で産生され得る。例えば、F(ab')₂ 重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、重鎖の CH、ドメイン及びヒンジ領域をコードする DNA 配列を含むように設計することができる。

【0052】

合成及び操作された抗体は、例えば、Cabilly et al., 米国特許第 4, 816, 567 号; Cabilly et al., 欧州特許第 0, 125, 023 B1 号; Boss et al., 米国特許第 4, 816, 397 号; Boss et al., 欧州特許第 0, 120, 694 B1 号; Neuberger, M. S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., 欧州特許第 0, 194, 276 号; Winter, 米国特許第 5, 225, 539 号; Winter, 欧州特許第 0, 239, 400 B1 号; Queen et al., 欧州特許第 0 451 216 号 B1; 及び Padlan, E. A. et al., 欧州特許第 0 51 959 6 A1 号; に記載されている。また、霊長類化抗体に関する Newman, R. et al., BioTechnology, 10:1455-1460 (1992) 及び Ladner et al., 米国特許第 4, 946, 778 号及び短鎖抗体に関する Bird, R. E. et al., Science, 242:423-426 (19

10

20

30

40

50

88))を参照。

【0053】

特定の実施形態において、抗体以外のポリペプチドに特異的に結合する薬剤(agents)、例えばペプチド、が使用される。特異的に結合するペプチドは、当該技術で公知のいずれの手段、例えば、ペプチドファージディスプレイライブラリーによって同定することができる。一般に、バイオマーカーの存在が検出及び／又は定量されるように、バイオマーカーポリペプチドを検出することができる薬剤(an agent)を使用することができる。本明細書で定義されるように、「薬剤」は、生体サンプル中のバイオマーカーを同定又は検出することができる物質を指す(例えば、バイオマーカーのmRNA、バイオマーカーのDNA、バイオマーカーのタンパク質を同定又は検出する)。特定の実施形態において、薬剤は、バイオマーカーポリペプチドに特異的に結合する標識された抗体である。

10

【0054】

加えて、バイオマーカーは、質量分析、例えばMALDI/TOF (time-of-flight, 飛行時間)、SELDI/TOF、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)、高速液体クロマトグラフィー質量分析(HPLC-MS)、キャピラリー電気泳動質量分析、核磁気共鳴分光法、又はタンデム質量分析法(例えば、MS/MS、MS/MS/MS、ESI-MS/MSなど)を使用して、検出することができる。例えば、米国特許出願第20030199001号、第20030134304号、第20030077616号を参照されたい。これらは参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0055】

質量分析法は、当技術で周知であり、且つ、タンパク質などの生体分子を定量及び／又は同定するために使用されている(例えば、Li et. al. (2000) Tibtech 18:151-160; Rowley et. al. (2000) Methods 20:383-397; 及びKuster and Mann (1998) Curr. Opin. Structural Biol. 8:393-400;を参照)。さらに、単離されたタンパク質の少なくとも部分的なde novo配列決定を可能にする質量分析技術が開発されている。Chait et. al., Science 262:89-92 (1993); M. Keough et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:7131-6 (1999); Bergman, EXS 88:133-44 (2000)にレビューされている。

30

【0056】

特定の実施形態において、気相イオン分光光度計が使用される。他の実施形態において、サンプルを分析するため、レーザー脱離/イオン化質量分析法を使用する。モデム(Modem)レーザー脱離/イオン化質量分析法(「LDI-MS」)は、2つの主要なバリエーションで実施することができる:マトリックス支援レーザー脱離/イオン化(「MALDI」)質量分析及び表面増強レーザー脱離/イオン化(「SELDI」)。MALDIにおいて、検体を、マトリックスを含有する溶液と混合し、そして液滴を基質(a substrate)の表面上に置く。次いで、マトリックス溶液は、生体分子と共結晶化する。基質を質量分析計に挿入する。レーザーエネルギーは、基質表面に向けられる。その場合、基質表面(it)は、生体分子(them)を著しく断片化することなく生体分子を脱着及びイオン化する。しかしながら、MALDIには分析ツールとしての限界がある。これは、サンプルを分画する(fractionating)ための手段を提供せず、且つ、マトリックス材料は、特に低分子量分析物の場合、検出を妨げる可能性がある。例えば、米国特許第5,118,937号(Hillenkamp et al.)、及び米国特許第5,045,694号(Beavis & Chait)を参照。

40

【0057】

質量分析計に関する追加情報については、例えば、Principles of Instrumental Analysis, 3rd edition. Skoog, Saunders College Publishing, Philadelphia

50

ia, 1985; 及び Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th ed. Vol. 15 (John Wiley & Sons, New York 1995), pp. 1071-1094; を参照。

【0058】

マーカー又は他の物質の存在の検出は、典型的には、シグナル強度の検出を含む。これは、次に、基質に結合したポリペプチドの量及び特徴を反映することができる。例えば、特定の実施形態において、特定のバイオマーカーの相対量を決定するために、第1のサンプル及び第2のサンプルのスペクトルからのピーク値のシグナル強度を比較することができる（例えば、視覚的に、コンピュータ分析などによって）。質量スペクトル分析を助けるため、Biomarker Wizardプログラム（Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, Calif.）などのソフトウェアプログラムを使用することができる。質量分析計及びその技術は、当業者に周知である。

【0059】

いずれの当業者は、質量分析計の構成要素のいずれか（例えば、脱着源、質量分析器、検出器など）及び様々なサンプル調製物を、他の句的な構成要素もしくは本明細書に記載の調製物と、又は当該技術で知られているものと、組み合わせることが可能である。例えば、特定の実施形態において、コントロールサンプルは重い原子（例えば、 ^{13}C ）を含有することが可能であり、それによりテストサンプルを同じ質量分析法操作(run)で既知のコントロールサンプルと混合することができる。

【0060】

特定の実施形態において、レーザー脱着飛行時間型（time-of-flight, TOF）質量分析計が使用される。レーザー脱着質量分析法では、結合マーカーを有する基質を入口系に導入される。マーカーは脱離し、そしてイオン化源からのレーザーによって気相にイオン化される。生成されたイオンは、イオン光学アセンブリによって収集され、及び次いで飛行時間型質量分析器において、短い高電圧場を介してイオンが加速され、そして高真空チャンバ内にドリフトされる。高真空チャンバの遠端では、加速されたイオンは、異なる時間において敏感な検出器表面に当たる。飛行時間はイオンの質量の関数であるので、特定の質量電荷比の分子の有無を識別するため、イオン生成とイオン検出器の衝突(impact)との間の経過時間を使用することができる。

【0061】

特定の実施形態において、第1又は第2のサンプル中に存在する1以上のバイオマーカーの相対量は、部分的に、プログラム可能なデジタルコンピュータでアルゴリズムを実行することによって決定される。前記アルゴリズムは、第1の質量スペクトル及び第2の質量スペクトルにおける少なくとも1つのピーク値を特定する。次に前記アルゴリズムは、第1の質量スペクトルのピーク値の信号強度を、質量スペクトルの第2の質量スペクトルのピーク値の信号強度と比較する。相対的な信号強度は、第1及び第2のサンプル中に存在するバイオマーカーの量の指標である。第1のサンプル中に存在するバイオマーカーの量をより正確に定量するため、バイオマーカーの既知量を含む標準物質(a standard)を第2のサンプルとして分析することができる。特定の実施形態において、第1及び第2のサンプル中のバイオマーカーの同一性を決定することもできる。

【0062】

D. キット

特定の非限定的な実施形態において、本開示は、患者のAAの重症度を同定するための、ならびにJAKインヒビター治療に応答する患者亜集団を同定及び追跡するための、キットを提供する。このようなキットは、特定の実施形態において、本明細書に記載のバイオマーカーから選択される1以上のバイオマーカー、又はそれらの組み合わせを検出するための手段を包含する。本開示は、対象者におけるAAを治療するための療法の有効性を決定するためのキットをさらに提供する。

【0063】

特定の実施形態において、対象者における円形脱毛症（Alopecia Areata, A A）を治療するためのキットは、対象者の疾患の重症度を示すバイオマーカーを検出するために有用な1つ以上の検出試薬、及びA Aの治療に有用な1つ以上の治療試薬を含む。本開示の主題は、対象者における、脱毛症（A A）を治療するのに有用な1つ以上の治療試薬に回答する傾向を示すバイオマーカーを検出するのに有用な1つ以上の検出試薬、及びA Aの治療に有用な1つ以上の治療試薬を含む、対象者における円形脱毛症（A A）を治療するためのキットをさらに提供することができる。特定の実施形態において、キットは、1つ以上のプローブセット、アレイ／マイクロアレイ、バイオマーカー特異的抗体及び／又はビーズをさらに含む。特定の実施形態において、キットは指示書をさらに含む。特定の実施形態において、前記治療試薬はJ A Kインヒビターから選択されてよい。

10

【0064】

キットのタイプは、パッケージされたプローブ及びプライマーセット（例えばT a q M a nプローブ／プライマーセット）、アレイ／マイクロアレイ、バイオマーカー特異的抗体及びビーズを包含するが、これらに限定されない。これらは、本開示の1つ以上のバイオマーカーを検出するため、1つ以上のプローブ、プライマー又は他の検出試薬をさらに含有する。方法を提供する。

【0065】

特定の非限定的な実施形態において、キットは、同定される1つ以上のバイオマーカー（複数可）を検出するための、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）又は核酸配列決定に好適な一対のオリゴヌクレオチドプライマーを包含することができる。一対のプライマーは、本明細書に記載のバイオマーカーに相補的なヌクレオチド配列を包含することができ、且つ、前記バイオマーカーと選択的にハイブリダイズするのに十分な長さであり得る。あるいは、相補的ヌクレオチドは、P C R及び／又は配列決定を行うために、バイオマーカー位置に十分に近接した特定の領域5'及び／又は3'に選択的にハイブリダイズすることができる。多数のバイオマーカーを同時にアッセイするため、多数の(multiple)バイオマーカー特異的プライマーをキット内に含めることができる。前記キットはまた、1つ以上のポリメラーゼ、逆転写酵素及びヌクレオチド塩基を包含することができ、前記ヌクレオチド塩基は、さらに検出可能に標識することができる。

20

【0066】

特定の実施形態において、プライマーは、少なくとも約10個のヌクレオチド又は少なくとも約15個のヌクレオチド又は少なくとも約20個のヌクレオチドの長さであり得、及び／又は約200個までのヌクレオチド、又は約150個までのヌクレオチド、又は約100個までのヌクレオチド、又は約75個までのヌクレオチド又は約50個までのヌクレオチドの長さであり得る。

30

【0067】

特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマーは、固体表面又は支持体上に、例えば核酸マイクロアレイ上に固定化することができる。その場合、固体表面又は支持体に結合した各オリゴヌクレオチドプライマーの位置は既知であり、且つ、同定可能である。

【0068】

特定の非限定的な実施形態において、キットは、同定されるべきバイオマーカー（複数可）を検出するために、i n s i t uハイブリダイゼーション又は蛍光i n s i t uハイブリダイゼーションに好適な少なくとも1つの核酸プローブを含むことができる。そのようなキットは、一般に、様々なバイオマーカーに対する特異性を有する1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを包含する。

40

【0069】

特定の非限定的な実施形態において、キットは、プライマー伸長によるバイオマーカーの検出のためのプライマーを包含することができる。

【0070】

特定の非限定的な実施形態において、キットは、同定されるべきバイオマーカー（複数

50

可)の免疫検出のための少なくとも1つの抗体を包含することができる。バイオマーカーに特異的なポリクローナル及びモノクローナルの両方の抗体は、当業者に一般的に知られているように、従来の免疫化技術を用いて調製することができる。キットの免疫検出試薬は、所与の抗体又は抗原それ自体に付随するか又はそれに連結された検出可能な標識を包含することができる。このような検出可能な標識は、例えば、化学発光もしくは蛍光分子(ローダミン、フルオレセイン、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、Cy 3、Cy 5又はROX)、放射性標識(^3H 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{131}I)又は酵素(アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ)を包含する。

【0071】

特定の非限定的な実施形態において、バイオマーカー特異的抗体は、個体支持体、例えばカラムマトリックス、アレイ、又はマイクロタイタープレートのウェルなど、に結合して提供され得る。あるいは、支持体をキットの別個の要素として提供することができる。

【0072】

特定の非限定的な実施形態において、キットは、本明細書に記載の1つ以上のバイオマーカー又はその組み合わせを検出するのに好適な1つ以上のプライマー、プローブ、マイクロアレイ、又は抗体を包含することができる。

【0073】

特定の非限定的な実施形態において、キットは、本明細書に記載のバイオマーカーの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14以上を検出するのに好適な1つ以上のプライマー、プローブ、マイクロアレイ、又は抗体を包含することができる。

【0074】

特定の非限定的な実施形態において、キット中の測定手段がアレイを使用する場合、上記のバイオマーカーのセットは、前記マイクロアレイ上に現れるマーカーの化学種(species)について少なくとも10%又は少なくとも20%又は少なくとも30%又は少なくとも40%又は少なくとも50%又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%を構成することができる。

【0075】

特定の非限定的な実施形態において、バイオマーカー検出キットは、バイオマーカーを検出するためのアッセイもしくは反応を実施するのに必要な、1つ以上の検出試薬及び他の成分(例えば、緩衝液、酵素、例えばDNAポリメラーゼもしくはリガーゼなど、鎖伸長ヌクレオチド、例えばデオキシヌクレオチドトリホスフェートなど、及びサングー型DNA配列決定反応の場合、鎖終結ヌクレオチド、陽性制御配列、陰性制御配列など)を包含することができる。キットはまた、バイオマーカーの検出に必要な追加の成分又は試薬、例えばウェスタンブロットリング免疫組織化学で使用するための二次抗体など、を包含することができる。キットは、他の予後予測因子、例えば腫瘍段階を評価するための1つ以上の他のバイオマーカー又は試薬をさらに包含することができる。

【0076】

キットは、バイオマーカーを標準物質と比較するための手段をさらに包含することができる、且つ、興味対象のバイオマーカーを検出するために当該キットを使用するための説明書を包含することができる。例えば、説明書は、本明細書に記載のバイオマーカーの存在が、患者のAAの重症度を示すこと、又はJAKインヒビター治療に応答する患者亜集団を同定及び追跡するためのものであることを説明することができる。

【0077】

特定の実施形態において、キットは、治療試薬をさらに包含し得る。特定の実施形態において、前記治療試薬は、本明細書の実施形態のJAKインヒビターであり得る。

【0078】

E. レポート、プログラムされたコンピュータ及びシステム

本明細書に記載の1つ以上のバイオマーカーのアッセイに基づいた試験(例えば、個体(an individual)のAAの重症度)又は個体の予測される薬物応答性(例えば、JAKイ

10

20

30

40

50

ンヒビター療法に対する応答)、及び/又は試験に関する他の情報は、本明細書では「レポート」と呼ぶことができる。場合によっては、テストプロセスの一部として具体的な(tangible)レポートを生成することができる(本明細書ではこれを、相互互換的に「レポートすること」、又はレポートを「提供すること」、レポートを「作成すること」又はレポートを「生成すること」と呼ぶことができる)。

【0079】

具体的なレポートの例は、紙(コンピュータで生成されたテスト結果の印刷など)もしくは同等のフォーマットでのレポート、及びコンピュータ可読媒体(例えばCD、USBフラッシュドライブもしくは他のリムーバブルストレージデバイス、コンピュータハードドライブ、又はコンピュータネットワークサーバなど)に格納されたレポート、を包含することができるが、これらに限定されない。レポート、特にコンピュータ可読媒体に格納されたレポートはデータベースの一部であり得る。前記データベースは、任意にインターネットを介してアクセス可能であり得る(例えば、患者及びその患者の医療従事者だけがレポートを閲覧できるように、レポートへのアクセスを制限するセキュリティ機能を有し、他の無許可の個人がレポートを閲覧することを防止する、「安全なデータベース」であり得る、コンピュータネットワークサーバ上に格納された患者記録もしくは遺伝情報のデータベースなど)。具体的なレポートの生成に加えて、あるいはそれに代えて、レポートをコンピュータ画面(又は別の電子デバイスもしくは機器のディスプレイ)に表示することもできる。

【0080】

レポートは、例えば、個人のAAの重症度を包含することができ、又は本明細書に記載の1つ以上のバイオマーカーの有無、レベルを包含するだけとすることができる(例えば、ネットワークサーバのようなコンピュータ可読媒体上のレポートには、特定のバイオマーカー又は特定のバイオマーカーのレベルを有する個体について、増加もしくは減少した疾患リスクなどの医学的/生物学的影響(implications)を記述する1以上のジャーナル出版物又はウェブサイトへのハイパーリンク(複数可)を含めることができる)。従って、例えば、レポートは、疾患リスクもしくは他の医学/生物学的意義(例えば、薬物反応性、示唆された予防的処置など)を包含することができ、ならびに場合によってはバイオマーカー情報も含むことができ、又は疾患リスクもしくは他の医学的/生物学的意義を含めることなく、バイオマーカー情報だけを包含することができる(それにより、当該レポート自体の外部のソースから、例えば医療従事者、出版物、ウェブサイトなどから、関連する疾患リスク又は他の医学的/生物学的意義を決定するため、レポートを閲覧している個人がバイオマーカー情報を使用することができる。これらは任意にハイパーリンクなどで当該レポートにリンクすることができる。))。

【0081】

レポートを、例えば、試験された個人、医療従事者(例えば、医者、看護師、臨床検査技師、遺伝カウンセラーなど)、健康管理機構、及び/又は当該レポートを閲覧又は所持することを意図したいずれの他の当事者もしくは依頼者に、さらに「送信」(transmitted)又は「伝達」(communicated)することができる(これらの用語は、本明細書では交換可能に使用することができる)。レポートを「送信する」又は「伝達する」行為は、当該レポートのフォーマットに基づいて、当該技術で公知のいずれの手段によって行うことができる。さらに、レポートを「送信する」又は「伝達する」ことは、レポートを送達すること(「プッシュすること」(pushing))及び/又はレポートを取り出すこと(「プルすること」(pulling))を包含することができる。例えば、レポートは、(例えば紙フォーマットのレポートについて)当事者間に物理的に転送されることを含めて、様々な手段によって、例えばある当事者から別の当事者に物理的に配達されることにより、又は電子的又は信号形式で送信されることにより(例えば、電子メール又はインターネット経由で、ファクシミリにより、及び/又は当技術で知られているいずれの有線又は無線通信方法により)、例えばコンピュータネットワークサーバなどに格納されたデータベースから検索されることなどにより、送信/伝達することができる。

【0082】

特定の例示的な実施形態において、開示される主題は、本明細書に記載の方法を実施するようにプログラムされたコンピュータ（又は生物医学デバイス又は実験装置などの他の装置／デバイス）を提供する。例えば、特定の実施形態において、開示される主題は、単独で、又は他のバイオマーカーと組み合わせて、本明細書に開示される1つ以上のバイオマーカーの同一性を受信（すなわち、入力(input)として）するように、且つ、バイオマーカー（複数可）のレベル又は同一性に基づいて、疾患重症度又は他の結果（例えば、薬物応答性など）を提供する（すなわち、出力(output)として）ように、プログラムされたコンピュータを提供する。そのような出力（例えば、疾患重症度、薬物反応性などの伝達）は、例えば、コンピュータ可読媒体上のレポートの形で、紙形式で印刷されるか、及び／又はコンピュータスクリーン又は他のディスプレイ上に表示され得る。

10

【0083】

開示される主題の特定の更なる実施形態は、個人のA Aの重症度を、又は個体がJ A K インヒビター治療から恩恵を受けるかどうかを決定するためのシステムを提供する。特定の例示的なシステムは、個人（又はそれらの医療従事者）がそのような個人のA A重症度（又は薬物応答）の決定を要求する統合された「ループ」を包含し、この決定は前記個人からのサンプルを試験することによって行われ、そしてこの決定の結果は依頼者に返される。例えば、特定のシステムでは、試験のために個人からサンプル（例えば、皮膚、血液など）が得られ（サンプルは当該個人によって、又は例えば医療従事者によって入手することができる）、前記サンプルは試験のために（例えば、単独で、又は1つ以上の他のバイオマーカーと組み合わせた、本明細書に開示されたバイオマーカー（複数可）を決定する）実験室（又は他の施設）に提出され、及び次いで、前記試験の結果を患者に送信しこれは場合によっては、その結果を前記個人に提供するか又は他の方法で伝える仲介者、例えば医療従事者、に最初に結果を送信することにより行われる）、それによって個人のA Aの重症度（又は薬物応答など）を決定するための統合ループシステムを形成する。（例えば、検査施設、医療従事者、及び／又は個人のいずれかの間で）結果が送信されるシステムの部分は、電子又は信号送信により（例えば、電子メールもしくはインターネットを介するなどのコンピュータによって、場合によって安全なデータベースであり得るウェブサイト又はコンピュータネットワークサーバ上に結果を提供することによって、電話もしくはファックスによって、当該技術において知られたいずれの他の有線もしくは無線伝送方法によって）実施することができる。

20

30

【0084】

特定の実施形態において、システムは、個人及び／又はそれらの医療従事者によって制御される、その場合、個人及び／又はそれらの医療従事者が試験を要求し、試験結果を受け取り、及び、疾病管理システムを導入することなどにより、疾病リスクを軽減するため、（場合によって）試験結果に作用する。

【0085】

本明細書に記載される様々な方法、例えばバイオマーカーの有無又はレベルをA Aの変化した（例えば、増加又は減少した）重症度と相関させることなどは、自動化された方法、例えば、本明細書に記載の方法のいずれかを実施するようにプログラムされたコンピュータ（又は他の装置／デバイス、例えば生物医学デバイス、実験器具、又はコンピュータプロセッサを有する他の装置／デバイス）を使用することによって、実施することができる。例えば、コンピュータソフトウェア（本明細書ではコンピュータプログラムと互換的に言及することができる）は、個人におけるバイオマーカーの有無を、当該個人についてA Aの変化した（例えば、増加又は減少した）重症度と相関させることができる。従って、開示される主題の特定の実施形態は、本明細書に記載の方法のいずれかを実行するようにプログラムされたコンピュータ（又は他の装置／デバイス）を提供する。

40

【0086】

F. 治療方法

特定の実施形態において、対象者における円形脱毛症（A A）を治療する方法は、前記

50

疾患の重症度を示すバイオマーカーを検出することによって、前記対象者の A A 疾病重症度を同定すること、及び前記同定された疾患の重症度に適切な治療的介入を前記対象者に投与すること、を含む。

【0087】

特定の実施形態において、対象者における A A を治療する方法は、上記傾向を示すバイオマーカーを検出することによって J A K インヒビター処置に応答する A A を有する対象者の傾向を同定すること、及び同定されたバイオマーカーが、前記対象者が前記インヒビターに応答するという傾向を示すならば、J A K インヒビターを前記対象者に投与すること、を含む。

【0088】

特定の実施形態において、それを必要とする対象者における円形脱毛症を治療する方法は、J A K インヒビターを前記対象者に投与するステップ、J A K インヒビター処置への応答性を示すバイオマーカーを検出するステップ、及び、(1) 前記 J A K インヒビターの投与を続けること (continuing)、(2) 前記 J A K インヒビターの投与を変更すること (altering)、又は (3) 前記 J A K インヒビターの投与をやめること (discontinuing) のいずれかによって、前記応答性に基づいて前記 J A K インヒビターの投与を適合させるステップ (tailoring)、を含む。

【0089】

特定の実施形態において、バイオマーカーは遺伝子発現シグニチャであってもよい。特定の実施形態において、前記遺伝子発現シグニチャは、以下の遺伝子群：K R T 関連遺伝子；C T L 関連遺伝子；及び I F N 関連遺伝子；のうちの一つ又はそれ以上の遺伝子発現情報を含む。特定の実施形態において、前記 K R T 関連遺伝子は、D S G 4、H O X C 3 1、K R T 3 1、K R T 3 2、K R T 3 3 B、K R T 8 2、P K P 1 及び P K P 2 を含む。特定の実施形態において、前記 C T L 関連遺伝子は、C D 8 A、G Z M B、I C O S 及び P R F 1 を含む。特定の実施形態において、前記 I F N 関連遺伝子は、C X C L 9、C X C L 1 0、C X C L 1 1、S T A T 1 及び M X 1 を含む。

【0090】

特定の実施形態において、1 つ以上の C T L 関連遺伝子又は 1 つ以上の I F N 関連遺伝子が所定の遺伝子発現レベルのセットにダウンレギュレーションされる場合、及び／又は 1 つ以上の K R T 関連遺伝子が所定の遺伝子発現レベルのセットにアップレギュレーションされる場合、前記治療は有効であると考えられ、且つ、継続することができる。特定の実施形態において、大多数の C T L 関連遺伝子又は大多数の I F N 関連遺伝子が所定の遺伝子発現レベルのセットにダウンレギュレーションされない場合、及び／又は大多数の K R T 関連遺伝子が所定の遺伝子発現レベルのセットにアップレギュレーションされない場合、前記治療は無効であると考えられ、且つ、例えば、1 つ以上の異なる J A K インヒビターを投与することによって、中止もしくは変更されてもよい。

【0091】

特定の実施形態において、遺伝子発現シグニチャは、円形脱毛疾患病活性係数 (A r e a t a D i s e a s e A c t i v i t y I n d e x, A L A D I N) である。特定の実施形態において、J A K インヒビターの投与を適合させることは、(1) C T L スコア、I F N スコア及び K R T スコアのそれぞれが処置前のスコアと比較して減少している場合、前記 J A K インヒビターの投与を続けること、(2) C T L スコア、I F N スコア及び K R T スコアのいずれも処置前のスコアと比較して低下しない場合、前記 J A K インヒビターの投与を変更すること、又は (3) C T L スコア、I F N スコア及び K R T スコアのそれぞれが治療前のスコアと比較して増加した場合、前記 J A K インヒビターの投与をやめること、を含む。

【0092】

特定の実施形態において、J A K インヒビター処置に対する応答性を示すバイオマーカーの検出は、前記 J A K インヒビターによる処置に対する応答性の生理的サイン (signs) が存在する前に、行われる。特定の実施形態において、前記検出は、J A K インヒビター

10

20

30

40

50

での処置の2週間後～6週間後に行われる。特定の実施形態において、前記検出は、J A K インヒビターでの処置の1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後、1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後、4ヶ月後、5ヶ月後、6ヶ月後、それらの組み合わせ、又はこれらの値のいずれか2つの間の範囲で、行われる。

【0093】

特定の実施形態において、前記J A K インヒビターの投与を変更することは、投与間隔、投与量、配合(formulation)又はそれらの組み合わせを変更することを含む。特定の実施形態において、前記特定のJ A K インヒビターが投与されることは中止されてもよく、且つ、異なるJ A K インヒビター(J A K インヒビターの異なるクラス又は同一クラスにおける異なるJ A K インヒビターのいずれか)を投与してもよい。

10

【0094】

特定の実施形態において、当該方法は、J A K インヒビターの投与前にJ A K インヒビター処置に対する応答性を示すバイオマーカーのベースラインレベルを確立することをさらに含む。特定の実施形態において、当該方法は、J A K インヒビターの投与を調整する前に、J A K インヒビター処置に対する応答性を決定するために、ベースラインレベルと、投与後のレベルとを比較することをさらに含む。

【0095】

特定の実施形態において、本開示のバイオマーカーの前記検出は、対象者から得られたサンプルに対して実施され、且つ、前記サンプルは、皮膚、血液、血清、血漿、尿、唾液、痰、粘液、精液、羊水、口腔洗浄液及び気管支肺胞洗浄液からなる群から選択される。特定の実施形態において、対象者はヒトである。特定の実施形態において、サンプルは皮膚サンプルである。特定の実施形態において、サンプルは血清試料である。

20

【0096】

特定の実施形態において、本明細書で開示されるバイオマーカーの前記検出は、核酸ハイブリダイゼーションアッセイを介して行われる。特定の実施形態において、前記検出は、マイクロアレイ解析を介して行われる。特定の実施形態において、前記検出は、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)又は核酸配列決定を介して行われる。特定の実施形態において、前記バイオマーカーはタンパク質である。特定の実施形態において、前記タンパク質の存在は、前記タンパク質と特異的に結合する試薬を用いて検出される。特定の実施形態において、前記試薬は、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合フラグメント、又はポリクローナル抗体もしくはその抗原結合フラグメントである。特定の実施形態において、前記検出は、酵素結合免疫吸着アッセイ(E L I S A)、免疫蛍光アッセイ又はウェスタンブロットアッセイを介して行われる。

30

【0097】

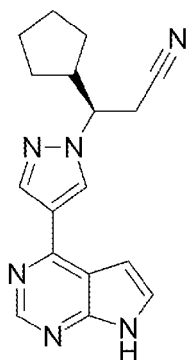
特定の実施形態において、J A K インヒビターは、J a k 1 / J a k 2 / J a k 3 / T y k 2 / S T A T 1 / S T A T 2 / S T A T 3 / S T A T 4 / S T A T 5 a / S T A T 5 b / S T A T 6 / O S M / g p 1 3 0 / L I F R / O S M - R β 遺伝子又はJ a k 1 / J a k 2 / J a k 3 / T y k 2 / S T A T 1 / S T A T 2 / S T A T 3 / S T A T 4 / S T A T 5 a / S T A T 5 b / S T A T 6 / O S M / g p 1 3 0 / L I F R / O S M - R β タンパク質と相互作用する化合物である。特定の実施形態において、前記J A K インヒビターは、以下から選択されてよい：

40

【0098】

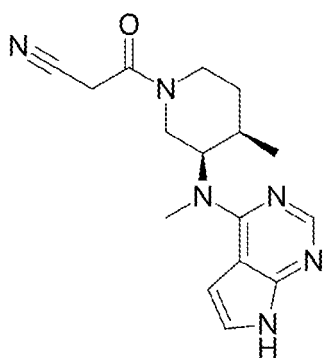
ルキシソリチニブ(I N C B 0 1 8 4 2 4)：

10



トファシチニブ (C P 6 9 0 5 5 0) :

20



パクリチニブ (S B 1 5 1 8) :

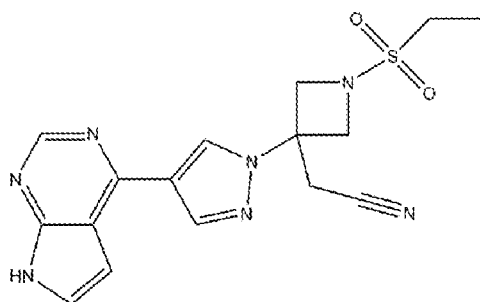
30

C1CCNCC1COc2ccc(Nc3nc4ccccc4n3)cc2COc5ccccc5

40

バリシチニブ (LY3009104) :

【化 4】

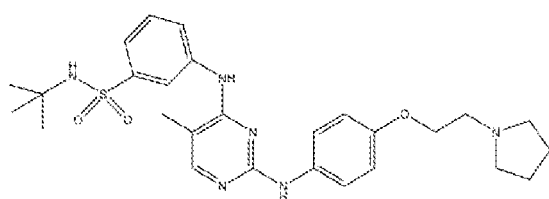


10

【 0 1 0 2】

フェドラチニブ (TG101348) :

【化 5】

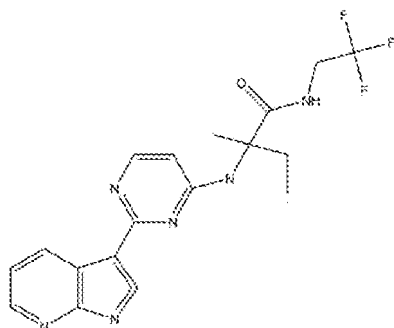


20

【 0 1 0 3】

デセルノチニブ(decernmotinib) :

【化 6】

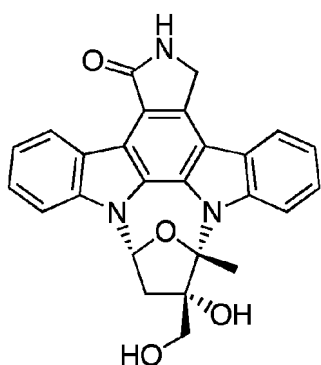


30

【 0 1 0 4】

レスタウルチニブ (CEP-701) :

【化 7】



40

50

【0105】

BMS-911543 (CAS Number: 1271022-90-2)、フルダラビン、3-没食子酸エピガロカテキン (epigallocatechin-3-gallate, EGCG)、ペフィシチニブ、ABT 494 (CAS Number: 1310726-60-3)、AT 9283 (CAS Number: 896466-04-9)、フィルゴチニブ、ガンドチニブ、INCB 39110 (CAS Number: 1334298-90-6)、PF 04965842 (CAS Number: 1622902-68-4)、R348 (R-932348, CAS Number: 916742-11-5; 1620142-65-5)、AZD 1480 (CAS Number: 935666-88-9)、セルジュラチニブ (cerdulatinib)、INCB 052793 (Incyte, 臨床試験ID: NCT02265510)、NS 018 (CAS Number: 1239358-86-1 (遊離塩基); 1239358-85-0 (HCl))、AC 410 (CAS Number: 1361415-84-0 (遊離塩基); 1361415-86-2 (HCl))、CT 1578 (SB 1578, CAS Number: 937273-04-6)、JTE 052 (Japan Tobacco Inc.)、PF 6263276 (Pfizer)、R 548 (Rigel)、TG 02 (SB 1317, CAS Number: 937270-47-8)、lumbicus rebellus 抽出物、ARN 4079 (Arrien Pharmaceuticals, LLC.)、AR 13154 (Aerie Pharmaceuticals Inc.)、UR 67767 (Palau Pharma S.A.)、CS510 (Shenzhen Chipscreen Biosciences Ltd.)、VR588 (Vectura Group plc)、DNX 04042 (Dynamix Pharmaceuticals/Clevexel)、ハイパーフォリン、その誘導体、それらの重水素化変種、それらの塩、又はそれらの組み合わせ。特定の実施形態において、検出試薬は、蛍光試薬、発光試薬、色素、放射性同位体、それらの誘導体、又はそれらの組み合わせから選択され得る。

【実施例】

【0106】

6. 実施例

当業者に、本出願の主題をどのように作成し、使用するかについての開示及び説明を提供するように、以下の実施例が提示される。以下の実施例は、本発明者らが現在開示されている主題とみなす範囲を限定するものではない。上述の一般的な説明を考慮すると、様々な他の実施形態が実施され得ることが理解される。

【0107】

6.1 実施例1

A. はじめに

円形脱毛症 (Alopecia areata, AA) は、毛包が免疫攻撃の標的である自己免疫皮膚疾患である。患者は、通常、頭皮上の脱毛の丸い又は卵形のパッチを特徴的に呈し、これは頭皮又は全身に関与するように、自発的に解消し、持続し、又は進行させることができる。この病気の3つの主要な表現型変異体は、パッチ型 (patchy-type) AA (AAP) (これは、しばしば頭皮上又は髭領域内の小さな卵形領域に局在化する)、全頭脱毛症 (alopecia totalis, AT) (これは頭皮全体を伴う)、及び全身性脱毛症 (alopecia universalis, AU) (これは全身の表面積を含む) である。現在、FDAがAAに対して承認した薬剤はなく、そして治療は経験的であることが多いが、典型的には、観察、病巣内ステロイド、局所免疫療法又は未証明効能の広範な免疫抑制治療を伴う。当該疾病のより深刻な形態、AU及びATは、しばしば治療に対して反抗的である。さらに、皮膚科医及び治療医の間で優勢な仮説は、長期にわたるAU及びATが回復不能になること、又は治療期間に対する応答時間及び治療に対する反応性の逆相関によりサポートされる、頭皮を「燃え尽き」状態に変えることである。その高い罹患率及び効果的な治療の必要性にもかか

わらず、この疾患の分子エフェクター及び細胞エフェクターの正体(identities)は十分に研究されていなかった。

【0108】

当該分野における最近の進歩は、病気の病因、薬剤標的、及び潜在的治療解決策(solutions)の理解を変えてきた。AAに関連する一塩基多型(single nucleotide polymorphisms)が特に注目され、これは、ULBP3及びULBP6の多型がこの疾患を発症するリスクを高めることを示唆する。遺伝子のULBPファミリーは、NKG2Dのリガンドとして機能するタンパク質をコードし、及び発現される場合、ナチュラルキラー細胞又はNKG2D発現CD8⁺ T細胞による免疫標的化のための細胞をマークする。これらのデータは、AA患者の病変頭皮生検標本の皮膚切片における球周囲(peribulbar)浸潤物における、並びに自発性AAのC3H/HeJマウスモデル由来の罹患皮膚及び皮膚排出リンパ節における、NKG2D担持CD8⁺ T細胞の認識を導いた。脱毛症を伴うC3H/HeJマウスからの未罹患(unaffected)C3H/HeJマウスへのこの細胞集団の養子移入は、脱毛症の誘発をもたらし、マウスAAモデルにおけるこれらのエフェクター細胞の中心的役割を実証した。

10

【0109】

本発明者らは、以前に、顕著なインターフェロン(IFN)シグニチャ及び共通ガンマ鎖サイトカイン(γ c)シグニチャを同定した。これらの両方は、AA発病に寄与すると仮定された。これらの知見に基づいて、シグナル伝達分子、ヤヌスキナーゼ(Janus kinase, JAK)、のファミリーの重要なメンバーの阻害に基づく治療戦略が、疾患のマウスモデル及び小さな一連のヒト患者におけるAAの治療に有効であることが見出された。遺伝子発現プロファイリングは、AAに対する小分子JAKインヒビターの選択において重要な役割を果たした。そして、異なるAA表現型を包含する、この点についての拡大された努力が、新規治療解決策並びに病原性メカニズムに対する更なる洞察を提供する可能性を有する。

20

【0110】

この研究において、一連のAA表現型を有する患者合計96人及び正常なコントロール患者から採取した120を超えるサンプルがプロファイリングされた。患者のサンプルは、毛髪の疾患に特化した皮膚科医による表現型の分類の後、米国全土の円形脱毛症全米登録サイトから収集した。次いで、AA特異的遺伝子発現シグニチャを同定するために、マイクロアレイに基づく遺伝子発現解析を用いて、皮膚生検サンプルを調べた。AT/AUが病気の「燃え尽きた」形態であるか、又は回復不可能であるという一般的な概念にもかかわらず、遺伝子発現解析によりAT/AUサンプルにおける顕著な量の免疫活性が見出されて、この免疫活性を破壊する治療が治療目的に有用であり得る可能性を示している。さらに、当該データに基づいて、円形脱毛症疾患重症度指数(ALADIN)が作成された。これは、AT/AUサンプル、AAPサンプル、及びNCサンプルを互いに効果的に区別し、且つ、従来の又は実験的な治療を受けている患者において、疾患活動を追跡するために使用されてよい、遺伝子発現測定基準であった。

30

【0111】

B. 結果

40

AA遺伝子シグニチャ

遺伝子発現プロファイリングは、63人の患者の発見データセット及び33人の患者の外部検証データセットからなる96人の患者からの122個のサンプルについて実行された(より完全な説明については、方法の項を参照)。20 AAP、20 AT/AU、及び23正常コントロール頭皮皮膚生検標本からなる発見データセットについて、マイクロアレイベースの遺伝子発現解析を行った。発現差異がある(differentially expressed)遺伝子は、AAサンプルversus正常コントロールの比較に基づいて同定された。この最初のサンプルセットからのデータの堅牢性を保証するために、追加の8 AAP、12 AT/AU、及び13正常コントロール頭皮皮膚生検標本を検証セットとして用いて外部検証を行った。この分析セットから、絶対倍率変化(fold change, FC) > 1.5及び

50

偽発見率 (FDR) < 0.05 で選択された発現差異がある遺伝子に基づいて、疾患特異的遺伝子発現プロファイルが生成された。AA 特異的疾患シグニチャは、発現の増加を示す 1083 個の Affymetrix プロブ及び AA における減少した発現を示す 919 個の Affymetrix プロブから構成された。

【0112】

注目すべきは、PRF1 及びいくつかのグランザイムを包含する細胞媒介性細胞傷害性に関連する遺伝子、並びに免疫細胞輸送ケモカイン遺伝子が、発現増加を示すものとして列挙された最上位の遺伝子の中にあった一方、DSMG4、FGF18 及び GPRC5D などの毛髪ケラチン関連遺伝子及び発生遺伝子は減少した発現を示すそれらの遺伝子の中にあった。遺伝子発現のパターンは、表現型グループを互いに区別した。ここで、正常なコントロール及び AT/AU サンプルが最大の不一致を示す (図 1A)。地形発現マップに前記サンプルをプロットすると、健常コントロール、AAP 患者、及び AT/AU 患者に対応する 3 つのクラスが明らかになった。これらの患者群は、地形マップを貫いてほぼ直線的な経路に沿って降下した (図 1B)。

【0113】

この地形内のその位置に基づいて、AAP 又は AT/AU であるいずれの所与のサンプルの相対リスクを評価する単一のスコアが生成された。このスコアは、転じて、AA と健常コントロールとの間で発現差異がある遺伝子のコンセンサスに基づいている (方法を参照)。得られたスコアは 0 ~ 10 の間に含まれ、10 は最大重症度のリスクを表し (AT/AU)、0 は最小限のリスクを表す (健常コントロール)。AAP サンプルは、これら 2 つの極値の中間範囲にあった (スコア範囲 2 ~ 6)。AAP と AT/AU の両方のコホート (cohorts) は健常コントロールと比較して統計的に分離可能な平均スコアを有していた (図 1B の箱ひげ図 (box-and-whisker plot))。発見データセットから示差的に発現された遺伝子は、バリデーションセット (図 6) における階層的クラスタリングによって AA サンプルを正常サンプルから区別することができた。これらのデータは、AA の病状が分子遺伝子発現レベルで発現可能であること、及び AAP サンプルが AT/AU と正常コントロールの中間である AA 特異的シグニチャを示すことを示唆している。

【0114】

AT/AU 皮膚サンプルは免疫学的に活性である

疾患シグニチャにおける免疫関連遺伝子の存在と組み合わせた、全般的遺伝子発現解析における、コントロール、AAP 及び AT/AU 間の分子分類の線形表示により、AT/AU サンプルが免疫学的に活性であるか否かが疑われた。AT/AU サンプルは、発現差異レベル及び発現差異のある遺伝子の数の両方に基づいて AAP のものよりもより重度の AA 特異的シグニチャを示すようであったため、AT/AU の遺伝子発現プロファイル、並びに健常コントロールと比較した AAP についての遺伝子発現プロファイル (that) は別々に検討した。FC > 1.5 及び FDR < 0.05 に基づく AT/AU 特異的疾患シグニチャは、発現が増加した 2239 個の遺伝子及び発現が減少した 1643 個の遺伝子から構成された。類似の閾値に基づく AAP 特異的疾患シグニチャは、より少ない数の発現差異がある遺伝子を示し、ここで、わずか 376 個の Affymetrix プロブが増加した発現を有し、537 個の Affymetrix プロブが減少した発現を有していた。AT/AU 特異的遺伝子リスト及び AAP 特異的遺伝子リストの比較は、2 つのリストの中で AAP 特異的遺伝子の重複を示した。ここで、AAP 特異的遺伝子は、AT/AU 特異的遺伝子リスト内にほとんど (few) 含まれていなかった (図 2A)。以前のデータに加えてこれらのデータは、AT/AU は「燃え尽きている」という仮説とは対照的に、AT/AU は、疾患のより局所化された AAP 形態よりもより複雑であり、より重症であることを示している。

【0115】

免疫関連遺伝子のより強固な発現に着目し、本発明者らは、別の方法を用いて AT/AU サンプルに見られるより重篤な遺伝子発現プロファイルを裏付けようと試みた。AAP サンプルと比較して、AA 中の最も豊富で最も機能的に関連する浸潤性免疫細胞である、

T細胞による浸潤がA T/A Uサンプルで観察された程度を決定するために、p a n-T細胞マーカーC D 3の免疫組織化学染色を、A T/A U、A A P、及びN Cサンプル上で行った。A T/A Uサンプルは、N Cサンプルの免疫浸潤量と比較して相対的な免疫浸潤量の有意な増加を示した(図2 B)。そして、球周囲/毛包周囲の浸潤の病理組織学的なスコアリングシステム(H P S)を使用すると、A I Pサンプルと比較して浸潤の増加傾向がさらに観察された(図2 C)。これらのデータは、A T/A Uサンプルが高い、且つ、持続した量の免疫活性及び炎症を示すことを示している。

【0116】

パスウェイ解析は、A A P又はA T/A Uサンプルのいずれかでアップレギュレートされたシグニチャについて実施した。興味深いことに、「移植片対宿主病」、「I型真性糖尿病」、「同種移植片拒絶」、「細胞接着分子」及び「抗原プロセッシング及び提示」を包含する、A A P及びA U/A Tの両方でアップレギュレートされたパスウェイの共有セット(図2 D~2 E)は、抗原提示遺伝子から構成され、A Aにおける毛包微小環境及び免疫活性化の免疫特権の喪失という病原性のテーマを支持する。興味深いことに、「ケモカインシグナル伝達経路」も有意にアップレギュレートされていることが分かり、他の自己免疫性皮膚疾患のために提案されているように、これらの細胞間輸送分子を治療目的に標的化する可能性を高めた。これらの結果は、A A中の活性な免疫経路の大部分が、疾患のより軽度の形態において、並びに疾患のより重症な形態において同じであることを示す。

【0117】

ペアリングされた(paired)病変(lesional)サンプル及び非病変(nonlesional)サンプルは、遺伝子発現プロファイルにおいて類似している

A A特異的遺伝子シグニチャが症状の発症後に存在するのか、又はむしろ未罹患の対象者からA A対象者を区別するために使用できるグローバルシグニチャの一部として存在するのかは不明である。A A患者からの非病変皮膚が、正常な患者の皮膚と有意に異なるかどうかを試験するため、A A患者からの非病変皮膚(A A P-L)の追加の18サンプルを、トレーニングセットのいびつとして対応する病変皮膚(A A P-L S)で分析した。そして対応するA A P-L Sを有する追加のA A P-N Lサンプル8個はバリデーションセットのために使用した。F C > 1.5及びp値<0.05に基づいて、A A P-L S皮膚及びA A P-N L間の発現差異がある遺伝子が決定された。ここで、27遺伝子はA A P-L Sが増加した発現を示し、143遺伝子はA A P-L Sが減少した発現を示す。遺伝子のこのセットの発現レベルの検討は、A A P-N LがA A P-L SとN Cとの間の中間であるプロファイルを示すことを示した(図3 A)。

【0118】

遺伝子発現によって検出可能なこれらの3つの集団間の差異をより明確に視覚化するために、主成分(principal component, P C)分析を行った。この分析は、遺伝子発現に基づいてサンプルを最大限に分離する非常に複雑なデータにおける最小の次元を同定することを試みる。この分析の最終結果は、類似の遺伝子発現プロファイルを有するサンプルが互いに密接にクラスタ化し、且つ、非類似のプロファイルを有するサンプルが互いに別々にクラスタ化することである。非病変サンプル(A A P-N L)は、P C分析の第1の成分に基づいて、患者適合性病変サンプル(A A P-L S、図3 B)から非常に可変の非類似性を示した(A A P-L S、図3 B)。最初の2つの主成分に対して全てのサンプルを配列することは、このデータと一致した。ここで、A A P-L S及びN Cサンプルは異種のクラスタリングを示し、且つ、A A P-N LはA A P-L SとN Cとの中間であるプロファイルを示した(図3 C)。検証データセットからの8個のA A P-L/A A P-N LペアのP C分析の第1の成分のプロットは、発見データセットにおいて観察されたペアにわたって同一の非常に可変の非類似性を示した。非病変サンプルと非病変サンプルとの間に示差的に発現される遺伝子を機能的アノテーションについて分析した。そして、非病変サンプル中に存在する最も一般的な遺伝子(但し、病変サンプルに存在しない)は、毛髪関連ケラチン及び一握りの炎症応答遺伝子であったことが分かった(図3 D)。C C L 5/13、P R F 1、G Z M B/K、I T G A M、及びC D 209を包含する免疫応答及

び浸潤に関連する遺伝子は、非病変サンプルから欠けていた。これらの結果は、A A 患者からの非病変サンプル生検は完全に病変領域に似ていない一方、健康なコントロール頭皮にも似ていないことを示している。これらのサンプルは、正常な、未罹患サンプルとは異なるが、病変サンプルに見られるように完全な自己免疫応答をまだ誘発していない中間状態で存在する。

【0119】

浸潤遺伝子発現シグニチャは、A A 表現型と相関する

A A P 及び A T / A U 患者コホート両方における有意な浸潤物の存在、及び遺伝子発現アレイコホートにおける免疫関連マーカー遺伝子の存在により、これらの浸潤物がマイクロアレイ解析において直接検出され得るか否かが疑われた。浸潤集団を検出する能力は、A A の病理学及び特徴付けに有益であることが証明するであろう。侵襲性免疫組織を同定するために、いくつかの浸潤性免疫細胞の各々を定義し、且つ、免疫遺伝子シグニチャ (Immune Gene Signature, I G S) として使用されるユニークな遺伝子発現シグニチャを採用した。この作業は、B 細胞、T 細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー及びマスト細胞を包含するがこれらに限定されない、いくつかの免疫型について、包括的で相互に排他的な遺伝子マーカーを提供した。これらの組織型のそれぞれの相対浸潤の数値的相対的測定値を、対応する I G S の発現の関数として構築した (図 4 A)。この測定基準を使用して、発明者らは、患者毎に各免疫組織の相対的浸潤を定量し、そして、A A 開始及び重症度との相関についてそれらを試験することができた (図 7 A ~ 7 B)。試験した浸潤物のうち、C D 8⁺ T 細胞及びナチュラルキラー細胞のランキングだけが、N C を A A P 又は A T / A U から分離する能力を有していた。C D 8 活性によるランキングは、3 つの臨床症状の間に用量依存性の分離を生じ、3 つの集団を有意に分離した (ハッシュは各コホートの中央値を表す)。N K 特異的マーカーは、C D 8⁺ T 細胞特異的マーカーの能力を反映していなかったが、相関は、N K 浸潤または共有 N K / C D 8⁺ T 細胞遺伝子の結果ではない可能性があることを示す。

【0120】

I G S メトリック(metrics)を用いて、本発明者らは、A A P サンプル (図 4 B、左の円グラフ(pie)) 及び A T / A U サンプル (図 4 B、右の円グラフ) を汚染する全浸潤シグナルも推定した。各免疫組織型の浸潤における全体的な推定変化も示されている (図 4 B、チャート)。遺伝子発現データから、0.8 ~ 1.4 % の推定浸潤物汚染が観察され、A A の増加した臨床的重症度と相関した。一致して、C D 8⁺ 浸潤物は、A A P 又は A T / A U 患者由来のサンプルにおいてのみ、全浸潤負荷量の 65 % 超からなっていた。3 つの症状(presentations)にわたる各免疫組織浸潤の絶対変化もまた示され (図 4 C)、C D 8⁺ 浸潤のみが 3 つの集団にわたって有意に変化することを示す。これらの結果は、複数の浸潤組織型に関するいくつかの発現に基づく証拠があるとはいえ、A A に関連する最も有意に存在する型は非 N K、C D 8⁺ 細胞であることを示す。さらに、本発明者らは、マクロファージ、総 C D 4⁺ T 細胞、C D 4⁺ T 細胞サブセット、N K 細胞及び B 細胞に関連するマーカーの上昇したレベルを検出することができたが、これらは C D 8⁺ T 細胞画分と比較してわずかな画分を示した。全体として、各サンプル内の汚染は比較的小さく、試験された免疫組織の全集団は全シグナルの約 3 % を超えない。

【0121】

さらに、患者サンプルで検出された相対 T h 1 及び T h 2 画分を推定するため、I G S スコアを用いた (図 4 D)。各患者 (A A 又は未罹患コントロール) について、サンプル生検内の T h 負荷は T h 1 : T h 2 シグナルの比として表され、そして、A A 患者サンプルは正常コントロールと比較してより高い T h 1 比へのシフトを示すことが観察された。A A 症状(presentation)に関連する T h 1 : T h 2 のランクシフトは、M a n n - W h i t n e y U 検定 ($p = 1.02 \times 10^{-4}$) によって統計学的に有意であり、全体として A A 患者由来の皮膚は、未罹患していない患者と比較して、T h 2 シグニチャに関連する T h 1 シグニチャの上昇したレベルを含有するが、T h 2 及び T h 2 シグニチャの両方を有する A A 患者がいることを示す。

【0122】

ALADINスコアは、疾患の表現型と平行している

本発明者らは、病状の定量的評価を可能にするであろうAA疾患シグニチャの最も顕著な特徴を同定したメトリックを作成しようとした。AAと健常コントロールとの間で発現差異がある遺伝子の加重遺伝子同時発現解析 (weighted gene co-expression analysis, WGCNA) は、同時発現遺伝子の20個のクラスタを明らかにした (図5A)。これら遺伝子セットは、共発現したモジュールを表し、共調節、共有された生物学的機能及び／又は共有経路の可能性を示す。これらのモジュールのそれぞれについて、本発明者らは、各モジュール内の遺伝子に由来する遺伝子発現シグニチャの第1の主成分を用いて、色分けされた固有遺伝子(eigengenes)又はメタ遺伝子(metagenes)を定義することができる。AAコホートとNCコホートとの間で差異的に発現された遺伝子のランク付けされたリストを有する、これらモジュールの遺伝子セット濃縮分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)、並びに、モジュールメタ遺伝子と疾患表現型との間の関連性の試験は、グリーンのモジュール及びブラウンのモジュールが疾患表現型と最も有意に関連していること、及びこれらのモジュール (図5B、8A及び8B) が、免疫及び免疫応答シグニチャ (グリーン) 及び構造ケラチン (ブラウン) を含有することを明らかにした。グリーンモジュールの経路濃縮分析は、自己免疫応答に関連するいくつかの遺伝子経路を明らかにした (図5C)。これは、CD8、CD4、MICB、CCL4/5、CCR7、及びICOSなどの遺伝子を包含した。パーフォリン及びグランザイムBの両方が、ICOS、IRF1及びCITAを包含する、GWAメタアナリシスによって以前に関与した遺伝子と同様に、検出された。

【0123】

オリジナルなスコアリングシステム、円形脱毛症疾患活動係数 (Areata Disease Activity Index, ALADIN) が開発された。これは、病気の重症度及び治療への応答を追跡するためのバイオマーカーとしての潜在的な使用のため、3次元定量的複合体遺伝子発現スコアであった。メトリックは、細胞傷害性Tリンパ球浸潤 (CTL)、IFN関連マーカー (IFN)、及び毛髪ケラチンパネル (KRT) の組み合わせに沿って患者を評価する。興味深いことに、CTLシグニチャは、2つの遺伝子、CD8A及びPRF1を含む。これらは上記のCD8 T細胞シグニチャを構成する (図4)。グリーンモジュールの構成要素を調べると、ALADIN CTLとIFNシグニチャの両方に含まれる遺伝子の存在が明らかになった。そして、ブラウンのシグニチャは、ALADIN KRTシグニチャを構成する遺伝子を含有していた。新しいデータセットに対するALADINの堅牢性を試験するために、患者CTL、IFN及びKRTスコアが決定された (図9)。96のAT/AU、AAP、及びNCサンプルの組み合わせた発見及びバリデーションデータセットのための3次元プロットは、AT/AUサンプルがNCサンプルから最も離れてクラスタリングされたことを示した。ここで、AAPサンプルは、これらのセット両方の間の中間位置に配置された (図5D)。後続のGSEAは、AAP及びAT/AUコホートの両方における正常コントロールと比較して、AAサンプルにおけるオリジナルのALADIN遺伝子セットの統計的に有意な濃縮を示した (図8C)。これらのデータは、ALADINスコアが重症度の異なるAA形態を区別できることを示し、及び臨床試験においてこのメトリックの使用を招く。

【0124】

さらに、本発明者らは、病気の期間がALADINスコアに影響を及ぼしたか否かを評価した。病気が5年以上経過したAT/AU患者由来の皮膚サンプルは、より短い期間のAT/AU患者のサンプルと比較した場合、IFN及びCTLスコアにおいて統計的に有意な減少を示した (図5E)。この関係は、長期及び短期AAPサンプルの間には見られなかった (図10)。これらのデータは、ALADINスコアが重症度が異なるAA形態を区別することができること、及びさらに、AAのより重篤な形態の中で炎症及び免疫浸潤スコアが時間の経過とともに減少することを示している。

【0125】

C. 考察

AAの生物学への基本的な洞察を行うため、マイクロアレイベースの全ゲノム遺伝子発現アッセイを利用した。ここでの作業は、AAを有する患者及び健常コントロール由来の120を超える頭皮生検標本の使用を包含する。本発明者らは、病因のいくつかの重要な特徴を同定するため、この方法を初めて利用する。

【0126】

第1に、AT/AUは、正常コントロール及びAAPサンプルと比較して、比較的高いレベルの免疫活性を示す。AT/AUの患者が効果的に治療できないという考えは、これらの患者を以前に利用可能な局所及び経口薬で治療することの歴史的困難と、重症患者の皮膚生検標本における相当数の未発達の(rudimentary)毛髪の特が困難であることに起因するようである。しかし、このデータは、AAPにおいて見られるものと等しい(より大きくない場合)AT/AUサンプルにおける持続的な免疫学的活性の証拠を提供することによって、このアイデアに挑戦する。AT/AUを有する患者におけるこの免疫活性は、AT/AU疾患の自発的解消の稀ではあるが、症例報告と組み合わせて、免疫応答の維持に必要な経路を標的とする、十分に強力な免疫抑制剤又は治療が、これらのタイプの患者にとって有効であり得ることを意味する。事実、最近の機能的データは、AAにおけるヤヌスキナーゼ媒介経路の役割を支持しており、及びいくつかの症例報告は、重症又は広範な疾患の場合でも、小分子JAKインヒビターがAAのための薬の有望なクラスと思われることを確証している。

【0127】

第2に、AAの分子の定義は、ヒト疾患の病因におけるCD8⁺T細胞の顕著な役割を支持する。NC、AAP及びAT/AUサンプルを比較した場合、用量応答のような関係が見られ、且つ、支持球周囲/毛包周囲T細胞傾向も観察され得る。以前の研究は、CD8⁺T細胞がAAのマウスモデルにおいて必要かつ十分であることを示した。そして、AA病因においてKG2Dの発現及びAAとNKG2DLとの間に見出される関連のためにCD8⁺T細胞の役割を示唆していた。当該データは、疾患の病因におけるCD8⁺T細胞の役割をさらに支持するだけでなく、CD8⁺T細胞の関与のレベルと疾患の重症度/表現型との間の相関をも引き出す。

【0128】

第3に、非病変AAP皮膚サンプルと病変AAP皮膚サンプルとの間の相対的類似性は、病変AAPと正常皮膚サンプルとの間に観察された関係と比較して、AA患者における未罹患皮膚は、AA患者の皮膚が脱毛を発症するよう仕向ける因子の少なくとも一部を共有することを示唆する。しかしながら、疾患の臨床的欠如のために、非病変皮膚のサンプルは、毛髪毛包の自己免疫破壊に必要な因子の完全なコンステレーション(constellation)を有しない。臨床的疾患の兆候のためには、耐性の崩壊に対するいくつかの免疫調節障害が克服されなければならないようである。ここで、これらの状況の全てが発生した場合にのみ脱毛症が観察される。AA患者由来の未罹患皮膚サンプルと罹患皮膚サンプルとの間の差異の更なる検討は、おそらく素因を有する(predisposed)個体における新たな治療又は予防戦略を明らかにする、AA発症のための最終的な刺激トリガーに関して有益であり得る。

【0129】

この仕事の主要部は、皮膚における疾患プロセスの分子的な定義を確立し、そしてタンパク質メディエーター又は細胞当事者に対応するシグニチャについて調べることができる。これらのデータは、AAにおける病原性疾患のメカニズム及び治療標的を追求する研究者のための豊富なリソースとして役立つ。

【0130】

D. 材料及び方法

人間の患者の人口統計

4つのNational Alopecia Areata Foundation (NAAF)登録サイトから2つの独立したデータセットを収集した。発見データセットは

、63人の患者からの81サンプルから構成された（20人のAAP、20人のAT/AU、及び23人の正常コントロール。AAPの18人はまた、AAP病変周囲と非病変との間の遺伝子発現の一対比較を可能にするため、非病変皮膚の生検を寄与した。）。検証データセットは、33人の患者からの41のサンプルから構成された。（8人のAAP、12人のAT/AU、及び23人の正常コントロール。前記AAP患者のうち8人はまた、AAP病変と非病変サンプルとの間の遺伝子発現の一対比較を可能にするため、非病変皮膚の生検を寄与した。）

【0131】

ヒト組織のサンプリング及び処理

皮膚パンチ生検標本をPAXgene Tissue Containersに固定し、コロンビア大学に一晩で輸送した。サンプルを二等分にした。サンプルの半分の、RNAを抽出するため、PAXgene組織miRNAキットを用いて処理し、そして残りの半分のパラフィンに包埋した。ライブラリー調製(prepare)は、Ovation RNA Amplification System V2及びBiotin Encoreキット（NuGen Technologies, Inc., San Carlos, CA）を用いたマイクロアレイ分析のために行った。その後、サンプルをヒトゲノムU133プラス2.0チップ（Affymetrix, Santa Clara, CA）にハイブリダイズさせ、コロンビア大学病理学コア又はYale Center for Genome Analysis（YCGA）においてスキャンした。

【0132】

分析パッケージ

マイクロアレイの品質管理は<http://arrayanalysis.org/>からのaffyAnalysisQCパッケージを使用して行った。バッチ効果補正であった。これらの研究における差次的発現は、絶対倍率変化(fold change)閾値1.5で定義した。有意差閾値0.05はBenjamini-Hochberg補正した。クラスタリング及び主成分分析はBioconductor Rパッケージに提供されたモジュールを使用して行われた。Cytoscapeでネットワーク画像を生成した。

【0133】

マイクロアレイの前処理及び品質管理

マイクロアレイの前処理は、RにおけるBioConductorを用いて行った。2つのデータセット、発見データセット（63サンプル）及び検証データセット（33サンプル）、の前処理は、同一パイプラインを使用して別々に実行した。品質管理は<http://arrayanalysis.org/>からのaffyAnalysisQCパッケージを使用して実施した。発見データセット及び検証データセットは、GCRMA及びMAS5を用いて別々に正規化した。Affymetrix HGU-133 Plus 2アレイは、54675プローブセット（PSID）を収容する。フィルタリングを行った。それにより、X又はY染色体上にあったPSID、AffymetrixコントロールプローブセットであったPSID、又はGene Symbol注釈をもたないPSIDを、更なる下流分析のために全てのアレイから除去した。ALADINスコアの3Dプロットについては、GCRMAの正規化及びバッチ効果の補正を行う前に、両方のデータセットからの全96サンプルを組み合わせた。

【0134】

サンプルフィルタリングバッチ修正

発見データセット中の63個のAA病変（AT/AU及びAAPの両方）及びNCサンプルについての分析を行うために、36954 PSIDを生じる少なくとも1つの63アレイ上の存在と呼ばれていなかったPSIDsを除去するため、PSIDsをさらにフィルタリングした。バッチ効果の補正は、共変量として使用される性別及びAA群（AT/AU、AAP、及び正常）を有するsvaパッケージで利用可能な関数ComBatの実施を用いて行った。検証セットにはバッチ修正は必要なかった。ペアリングされた病変/非病変マイクロアレイは、正常のコントロールと一緒に同一マイクロアレイバッチ内で

一緒に処理された。ペアリングされた病変／非病変分析のための発見セットは、18病変／非病変A A Pペアと23コントロールとから構成された。検証セットは、8つの病変／非病変A A Pペアと13のN Cサンプルとを有した。

【0135】

ペアリングされた病変及び非病変サンプル間の関係を検討するため、P S I Dを、各バッチ内の正常サンプルの平均発現レベルに集中させた。バリデーションセットはバッチ修正を必要としなかった。

【0136】

発現差異解析(differential expression analysis)

B i o c o n d u c t o rにおけるl i m m aパッケージに実装されている線形モデルを使用して、バッチ修正された発見データセットに対して微分解析を実施した。A A患者対(versus)正常コントロール、A A P患者対正常コントロール、及びA T／A U患者対正常コントロールにおいて発現差異があるP S I Dを同定するため、2サンプル比較を別々に実施した。性別を固定因子として扱った。一対比較を、性別を固定効果として扱う、A A P－L S／A A P－N Lサンプルに対して行った。

【0137】

遺伝子発現シグニチャに保持された誤った発見の数を減少させるため、ほとんどのP S I Dについてl o g 2 (fold-change)が1を超えなかったため、本発明者らは、発見データセットをサブサンプリングした。一度に1バッチ由来のサンプルを除外し(leaving out)、且つ、全データセット並びに全サブサンプリングにおいて発現差異があると識別されたP S I Dのみを保持した。

【0138】

主成分分析

発現差異解析を行うために使用された全ての36954 P S I Dについて、主成分分析を実施した。2変量分布を仮定しながら、各グループ(A T／A U、A A P、N C)について、最初の2つの主成分の確率密度を推定した。主成分分析を行った。発見セットにおける41 A A P－L S、A A P－N L、及び正常コントロールサンプルは、発現差異があると同定された170 P S I Dを使用した。

【0139】

組織病学的染色

免疫組織化学は、クローンL N 1 0抗C D 3一次抗体を用いたB o n d P o l y m e r R e f i n e R e d D e t e c t i o n (L e i c a B i o s y s t e m s , B u f f a l o G r o v e , I L)プロトコルを用いて行った。球周囲／毛包周囲病理組織学スコアリングシステム(H P S)を、図2 Cに示す代表的な例で、0～3スケール(0－免疫浸潤なし；1－軽度；2－中間；3－重度)を用いて行った。K r u s k a l - W a l l i s検定を用いて、C D 3スコアの平均ランクが全群において0.05の有意水準において同じであったという帰無仮説は否定された($H=16.51$, $df=2$, $p=0.00026$)。W i l c o x o nの順位和検定は、全ての一対比較について実施され、B o n f e r r o n i補正を用いて多重比較について調整された。A U／A T群及び正常群($p=4e-04$)とA A P群及び正常群($p=0\sim 4$)との間に有意差が認められた(分布＝「漸近」(asymptotic)を使用するRにおけるcoinパッケージからのw i l c o x _ t e s t)。

【0140】

A A重症度のための線形ユークリッド分類指標(classifier)の生成

A A疾患シグニチャの主成分分析及び地形マッピングは、最初の2つの主成分(principal components, P C)によって規定された発現空間におけるN C、A A P、及びA T／A U患者間の近線形依存性を明らかにした。発現地形マップは、ユークリッド距離をメトリックとして、10個の最近傍をクラスタリングパラメータとして使用する、M e Vソフトウェアスイートで生成された。これは、重症度を予測する、より直感的な数値スコアに変換するために、本発明者らは、P C 1及びP C 2に有意に寄与する遺伝子のリストを生

成した。これは、各PCに対する遺伝子の加重寄与を順位ソートし、そして、重み分布の変曲点の前に遺伝子のセットを選択することによって行われた。次いで、これらの遺伝子の発現ベクターをzスコア変換し、そして、非ゼロの、統計的に比較可能な発現値を生成するため、順位正規化した。患者毎に、適切なPCベクター中の重心値を構築するため、各正規化ベクター中の全ての遺伝子を使用した。各重心値は、その後、各患者についてPC1 x PC2として定義されたグリッドの基点に対応する。次に、{PC1min x PC2min}と{PC1max x PC2max}との間に直線投影を構築し、そして各患者をこの線にマッピングした。次いで、0から10の間の値を結びつけるためにベクターを正規化した。各コホートのスコアブレイクポイント(NC 0-2、AAP 2-6、AT/AU 6-10)は、各スコア範囲内に入るNC及びAAP、並びにAAP及びAT/AUのオッズ比を最大化するスコア値を同定する、スライディングウィンドウ分析を行うことにより得られた。

10

【0141】

コンセンサス免疫遺伝子シグニチャの生成

浸潤集団の各々についてユニークなシグニチャ遺伝子が採用された。浸潤をランキングする相対的な分類指標(classifiers)を生成するため、相互に排他的な遺伝子の各グループを、個々の患者ごとにコンセンサススコアに統合する前に、共分離及び識別力について独立に試験した。統合は、以下のステップにおいて行われた：スケール比較可能な発現値を得るために全ての遺伝子ベクターを形質転換するzスコア；各遺伝子シグナルについて順序付けられた非負の値を得るため、これらのベクターを順位変換するステップ；及び各浸潤組織について順位序列発現のコンセンサス値を作成するため、ランクを最終的に平均化するステップ。1サンプルあたりの全浸潤負荷量の推定のために、コンセンサスzスコアを各個々の遺伝子の発現スペースに戻して変換し、そして、集団全体にわたる最小変動係数を有するハウスキーピング遺伝子のコンセンサスに正規化した。

20

次の表は、各細胞タイプのシグニチャを示す。

【0142】

【表 2】

Cell	Symbol	Entrez	Probe
aDCs	CCL1	6346	207533_at
aDCs	CD83	9308	204440_at
aDCs	LAMP3	27074	205569_at
B-cells	BLK	640	210934_at
B-cells	CD19	930	206398_s_at
B-cells	MS4A1	931	228599_at
DCs	CCL13	6357	216714_at
DCs	CCL17	6361	207900_at
DCs	CCL22	6367	207861_at
DCs	CD209	3083	207278_s_at
Eosinophils	CCR3	1232	208304_at
Eosinophils	GPR44	1125	216464_x_at
Eosinophils	IL5RA	3568	211517_s_at
iDCs	CD1A	909	210325_at
iDCs	CD1E	913	215784_at
Macrophages	CCL7	6354	208075_s_at
Macrophages	CXCL5	6374	215101_s_at
Macrophages	FN1	2335	216442_x_at
Macrophages	MSR1	4481	214770_at

10

20

Macrophages	PPBP	5473	214146_s_at
mast cells	CMA1	1215	214533_at
mast cells	MS4A2	2206	207497_s_at
mast cells	TPSAB1	7177	216485_s_at
Neutrophils	FPRL1	2358	210773_s_at
Neutrophils	IL8RA	3577	207094_at
Neutrophils	IL8RB	3579	207008_at
NK cells	NCR1	9437	217095_x_at
NK cells	XCL1	6375	206366_x_at
Normal	DCN	1634	242605_at
pDC	CLEC4C	1704	1555687_a_at
T-cells	CD2	914	205831_at
T-cells	CD247	919	210031_at
T-cells	CD28	940	211861_x_at
T-cells	CD3E	916	205456_at
T-cells	CD3G	917	206804_at
T-cells	CD6	923	213958_at
T-cells	IL2RB	3560	205291_at
T-cells	ZAP70	7535	214032_at
CD8 T-cells	CD8A	925	205758_at
CD8 T-cells	PRF1	5551	214617_at
Cytotoxic cells	KLRF1	5134	220646_s_at
Cytotoxic cells	GNLY	1057	37145_at
Cytotoxic cells	GZMA	3001	205488_at
Cytotoxic cells	GZMH	2999	210321_at
Cytotoxic cells	GZMK	3003	206666_at
Tem	LTK	4058	217184_s_at
Tem	NFATC4	4776	236270_at

10

20

30

【 0 1 4 3 】

無監督の(unsupervised)機械学習、加重遺伝子共発現解析

加重遺伝子共発現解析(Weighted Gene Co-expression Analysis, WGCNA)は、全てのP S I Dの分散(variance)の中央値を超えているC o m B a t 調節発現セットにおけるP S I Dに対して実施した。P S I D間の隣接性(adjacency)は、1 0に設定されたソフト閾値化出力に上昇されたサンプルにわたる発現プロファイルのピアソン相関として定義された。得られた隣接行列は、相違行列が算出されたトポロジカルオーバーラップ行列(Topological Overlap matrix, T O M)に変換した。非類似行列に対して階層クラスタリングを行い、そして樹状図の得られる枝からモジュールを同定した。図5における共発現ヒートマップと樹状図は、T O Mを隣接基準として使用して、2 0個のモジュールに割り当てられたP S I Dの1 / 3の層別サンプリングから作成された。モジュール固有遺伝子(eigengenes)とカテゴリー形質との間の関連、疾患表現型、性別、及びN A A F サイト由来(originating)について試験するため、K r u s k a l - W a l l i s 検定を実施した。P e a r s o n の相関係数及びp 値は、各モジュール固有遺伝子と対象者年齢の間で推定した。異なるWGCNAモジュールにおける正常コントロールに関して、A A において過剰／過少発現した遺伝子の過剰出現についてさらに試験するため、遺伝子セット

40

50

濃縮分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) を使用した。正規化された濃縮スコア (normalized enrichment score, NES) は、モジュールサイズの差異を考慮に入れて、ランク付けされた遺伝子リストの上位または下位において、遺伝子セットが過剰出現される程度を反映する。予備ランク付けされた遺伝子リストは、ランキングのために t 統計で作成された。

【0144】

ALADIN スコアの計算

CTL、IFN 及び KRT ALADIN スコアを各サンプルについて計算した。簡潔に述べると、正常コントロールの平均及び標準偏差と比較して各 PSSID について z スコアが計算される。各遺伝子の z スコアは、その遺伝子にマッピングされた PSSID の z スコアを平均することによって得られる。次いで、シグニフィカンススコアは、対応するシグニフィカンスに属する遺伝子についての z スコアの計算された平均である。

【0145】

6. 2 実施例 2

A. はじめに

AA は、表現型的には、脱毛により特徴付けられ、且つ、組織学的には、毛包球を取り囲む T 細胞に浸潤することによって特徴付けられる、T 細胞媒介自己免疫疾患である。全 T 細胞 (但し、B 細胞又は血清ではない) の移動は、ヒト異種移植モデルにおける、並びにヒト AA とかなり類似した自発的 AA を発症するマウス株である C3H/HeJ マウスにおいて、疾患を引き起こし得る。広範に作用する病巣内ステロイドは、AA に対して最も一般的に用いられる療法であり、様々な成功を収めている。合理的に標的化された効果的な治療法の開発に進展は、AA における根底にある主要な T 細胞炎症性経路の機構的理解の欠如によって制限されていた。

【0146】

CD8 + NK G2D + T 細胞の細胞傷害性サブセットが、ヒト AA 毛包を取り囲む浸潤物内で同定された。また、「危険信号」ULBP3 及び MICA、2 つの NK G2D リガンド (NK G2DL)、及び 2 つの NK G2D リガンドの毛包自体における付随するアップレギュレーションも同定された。疾患の病因におけるその重要性は、ゲノムワイドな関連研究によっても示唆されている。

【0147】

B. 結果

AA 病因に対する CD8 + NK G2D + T 細胞の寄与を決定するために、本発明者らは、自発的に脱毛症を発症し、且つ、ヒト AA の多くの病理学的特徴を再現する (recapitulates) C3H/HeJ マウスモデルを使用した。脱毛症マウスの病変皮膚生検において、CD8 + NK G2D + T 細胞は毛包の上皮層に浸潤する。これは、ヒト AA の皮膚生検において観察されたものと同様に、NK G2DL、H60 及び Rae-1 を過剰発現する (図 11A ~ 11B)。皮膚における CD45 + 白血球集団のフローサイトメトリー分析は、疾患のない C3H/HeJ マウスと比較して、皮膚リンパ節腫脹及び総細胞充実性の増加と併せて、罹患 C3H/HeJ マウスの皮膚における CD8 + NK G2D + T 細胞数の顕著な増加を明らかにした (図 11C ~ 11D)。CD4 + T 細胞 4 及びマスト細胞を包含する、他の細胞タイプは、はるかに少ない数で存在した。

【0148】

AA を有するマウスにおける皮膚浸潤 CD8 + T 細胞の免疫表現型は、皮膚リンパ節に見出される CD8 + NK G2D + 集団のものと類似していた: CD8 $\alpha\beta$ + エフェクターメモリー T 細胞 (TEM, CD8 hi CD44 hi CD62L low CD103+) は、CD49b 及び NK G2A、NK G2C 及び NK G2E を包含する、複数のナチュラルキラー (NK) 免疫受容体を保持する (図 11E)。これらの CD8 + TEM 細胞は、高レベルの IFN- γ を発現し、ex vivo で増殖した同系真皮鞘標的細胞に対して、NK G2D 依存性細胞傷害性を示した (図 11F)。RNA-seq を用いた脱毛症 C3H/HeJ リンパ節細胞から単離した CD8 + NK G2D + T 細胞の遺伝子発現解析は、エフェクター

細胞傷害性Tリンパ球（CTL）に特徴的な転写プロファイルを示し、且つ、いくつかの追加のNK特異的転写物を同定した。

【0149】

本発明者らは次に、疾患の病因におけるこれらCD8+TEM細胞の必要性を評価した。罹患(diseased)マウス由来の細胞傷害性CD8+KG2D+細胞又は全リンパ節細胞の転移は、移植後14週までに5匹の健常C3H/HeJレシピエント全てにおいてAAを誘発した一方、NKKG2D+細胞を枯渇したリンパ節細胞集団は疾患を転移させることができなかった（図11G）。従って、CD8+KG2D+T細胞は真皮浸潤物中の優勢細胞型であり、AAのT細胞介在転移のために必要かつ十分である。

【0150】

C3H/HeJマウス及びヒトAAからのAA病変皮膚の転写プロファイルの特徴づけるため、AAを有する個体と、疾患のないコントロール個体由来の皮膚との間で、皮膚における発現差異がある遺伝子を同定するため、本発明者らはAffymetrixマイクロアレイ分析を行った。3つの遺伝子発現シグニチャが、病変皮膚において同定された：ヒト及びマウスのAA皮膚の両方において、IFN応答遺伝子、例えばIFN-誘導性ケモカインCXCL-9、CXCL-10及びCXCL-11をコードするものなど、いくつかの重要なCTL特異的転写物、例えばCD8A及びグランザイムA及びBをコードするものなど、並びにγcサイトカイン及びそれらの受容体、例えばインターロイキン-2（IL-2）及びIL-15の転写物など。IL-2Rαは、ヒトAA毛包周囲の浸潤リンパ球上で発現することが以前に示されていたので、本発明者らは、皮膚におけるIL-15のソースを同定するため、IL-15及びそのシャペロン受容体IL-15Raの両方について免疫蛍光分析を行った。本発明者らは、ヒトAA及びマウスAAの両方においてAA毛包における両方の成分の顕著なアップレギュレーションを検出し、そして、ヒトにおける浸潤性CD8+T細胞上に発現されたIL-15Rβを見出した。

【0151】

IL-2及びIL-15は、IFN-γ産生CD8+エフェクターT細胞及びNK細胞による細胞傷害活性の周知のドライバーであり、自己反応性CD8+T細胞の誘導及び／又は維持に関与している。in vivoでのIFN-γ-及びγc-標的療法の有効性を試験するために、本発明者らは、AAのよく確立した移植片モデルを使用した。ここで、自然発生的なAAを有するマウスからの皮膚移植片を10週齢の未罹患レシピエントC3H/HeJマウスの背中に移植する。このモデルでは、AAは6～10週間以内に移植されたレシピエントの95～100%において確実に発症し、疾患の予防または回復を目的とした介入を試験することを可能にする。

【0152】

AAにおけるIFN-γの役割は、ノックアウト研究及びIFN-γの投与の両方を使用して、以前に調査された。その場合、IFN-γ欠損マウスが耐性及び外因性IFN-γ沈降疾患であった。移植時にIFN-γに対する中和抗体の投与は、移植されたレシピエントにおけるAA発症を防ぎ、そして、皮膚における主要組織適合複合体（major histocompatibility complex, MHC）アップレギュレーション及びCD8+NKKG2D+浸潤を抑制した(abrogated)（図12A～12C）。同様に、AA病因におけるIL-2の役割は、C3H/HeJバックグラウンドに対するIL-2ハプロ不全が移植片モデルを使用する約50%だけ、病気耐性を付与する遺伝子実験を使用して以前に確立されていた。そして、この役割は、ヒトにおいてゲノムワイドな関連研究により支持されている。IL-2（図12D～12F）又はIL-15Rβ（図12G～12I）のいずれかに対する全身投与ブロッキング抗体は、移植マウスにおけるAAを防ぎ、皮膚におけるCD8+NKKG2D+T細胞の蓄積を阻止し、そしてMHCアップレギュレーションを抑制した(abrogated)。しかし、IL-2遮断は、移植C3H/HeJマウスにおけるAAの発症を妨ぐことに失敗した。特に、これらのブロッキング抗体単独では、確立されたAAを逆転させることができなかった（データ示さず）。

【0153】

本発明者らは次に、広範囲の細胞表面受容体の下流にシグナル伝達する J A K キナーゼの小分子阻害剤を用いて下流に介入することによって、本発明者らが、I 型サイトカイン遮断の効果を再現できるかどうかを検討した。特に、I F N - γ 受容体及び γ c ファミリー受容体は、それぞれ J A K 1 / 2 及び J A K 1 / 3 を介してシグナル伝達する。J A K の活性化は、ヒト及びマウスの脱毛症の毛包において、リン酸化されたシグナル伝達兼転写活性化因子 (signal transducer and activator of transcription, S T A T) タンパク質 (p S T A T 1、p S T A T 3 及びより少ない程度では p S T A T 5) の存在によって示されたが、正常な毛包においては示されなかった。C 3 H / H e J マウス由来の in vitro 培養真皮鞘細胞では、外因性 I F N - γ は S T A T 1 活性化を増加させた一方、I F N - γ + T N F - α は表面 I L - 1 5 発現を増加させた。I F N - γ R シグナル伝達に重要な J A K 1 / J キナーゼ (J A K 選択性は、J A K 1 = J A K 2 = T y k 2 > > > J A K 3 である) のアメリカ食品医薬品局 (F D A) 承認小分子インヒビターである、ルキシソリチニブ (R u x o l i t i n i b) は、これらの応答を阻害した。C 3 H / H e J マウス由来の培養 C T L エフェクターにおいて、F D A 承認小分子 J A K 3 インヒビタートファシチニブ (J A K 3 > J A K 1 > > J A K 2 選択性) は、I L - 1 5 誘発 p S T A T 5 活性化を遮断した。トファシチニブはまた、真皮鞘細胞の殺傷及びグランザイム B の I L - 1 5 誘発アップレギュレーション及び I F N - γ 発現を遮断した。

【0154】

これらのシグナル伝達経路の阻害が in vivo で治療的に有効であるかどうかを試験するために、本発明者らは、移植時にルキシソリチニブ (図 1 3 A ~ 1 3 C) 及びトファシチニブ (図 1 3 F ~ 1 3 H) を全身投与した。そして、それらが、移植された全てのレシピエントにおける A A の発症及び C D 8 + N K G 2 D + T 細胞の拡大を防止することを見出した。

【0155】

いずれか一方の薬剤で処理したマウスの皮膚は、組織学的な炎症の徴候を示さなかった (図 1 3 D 及び 1 3 I)。全皮膚生検の全体的転写分析は、両方の薬剤が、円形脱毛症疾患活動係数 (A L A D I N、図 1 3 E 及び 1 3 J) 及び遺伝子発現ダイナミックインデックス (Gene Expression Dynamic Index, G E D I) 分析によって測定される皮膚の炎症性シグニチャも遮断することを示した。

【0156】

次に、本発明者らは、全身性トファシチニブ治療が、移植後 7 週間に治療を開始することによって確立された疾患を逆転できるかどうかを質問した。全身療法は体全体に実質的な毛の再生をもたらし、C D 8 + N K G 2 D + T 細胞の頻度を低下させ、及び組織学的マーカーを逆転させたが、これらの全ては治療の中止後 2 ~ 3 ヶ月間持続した。

【0157】

次に、より臨床的に関連する送達経路を試験するために、本発明者らは、タンパク質チロシンキナーゼ阻害剤の局所投与が、全身送達の動力学に類似した動力学を有するマウスにおいて確立された A A を逆転できるか否かを尋ねた。確立された疾患では、本発明者らは、局所ルキシソリチニブ及び局所的トファシチニブが両方とも、治療された病変 (背中の皮膚に適用される) において疾患を逆転させるのに非常に有効であることを見出した。ルキシソリチニブ又はトファシチニブで処置したマウスにおいて、毛の完全な被覆が 7 週間の処置によって現れた。そして、本発明者らは、局所療法後 1 2 週間以内に完全な毛の再生を観察した (図 1 4 A ~ 1 4 B)。局所療法は、処置された皮膚及びリンパ節における C D 8 + N K G 2 D + T 細胞の著しく減少した割合 (図 1 4 C) と、A L A D I N 転写シグニチャの正規化 (図 1 4 D) と、疾患の組織学的マーカーの逆転 (図 1 4 E) と、全ての処置されたマウスにおける G E D I の修正と関連した。特に、腹部の未治療領域は脱毛症のままであり (例えば、図 1 4 A)、局所療法が局所的に作用したこと、及び観察された治療効果が全身吸収の結果ではないことを実証した。これらの効果は、治療の開始後早くも 2 ~ 4 週間で視認され、且つ、治療の中止後 2 ~ 3 ヶ月間持続した (図 1 4 A)。

【0158】

AAを有するヒト対象者におけるJAKインヒビターの有効性を試験するために、本発明者らは、軽度から重度の疾患の3人の患者を、1日2回、20mgのルキシリチニブで経口的に処置した。ルキシリチニブは現在、造血成長因子受容体の下流に野生型及び突然変異体JAK2シグナル伝達によって引き起こされる疾患である骨髄線維症の治療のためにFDA承認されている。さらに、乾癬における局所的ルキシリチニブを用いた小規模な臨床研究では、IL-17シグナル伝達軸の中断に起因する抗炎症活性が実証されている。ルキシリチニブで治療した3人の患者の全ては、経口治療の3～5ヶ月以内にほぼ完全な毛の再成長を示した（例えば、図14F）。ベースライン時及び12週間の処置後に得られた生検の比較は、減少した毛包周囲のT細胞浸潤と、ヒト白血球抗原クラスI及びクラスII発現の減少した毛包発現（図14G）と、置後のALADIN炎症性及び毛髪ケラチンシグニチャの正規化（図14H及び14I）と、を実証した。

10

【0159】

C. 考察

まとめると、当該データは、CD8+KG2D+ T細胞が、毛包の自己免疫攻撃の原因となる細胞溶解性エフェクターとして作用しながら、AA病原性を促進することを示唆している。本発明者らは、CD8 T細胞によって産生されたIFN- γ は、IL-15の更なる産生及びI型細胞自己免疫を促進するフィードフォワードループを誘導しながら、毛包における免疫特権の崩壊をもたらすと仮定する。JAK1/2インヒビタールキシリチニブによる治療に対する少数のAA患者の臨床反応は、この化合物、又は現在臨床開発中の他のJAKタンパク質チロシンキナーゼ阻害剤の将来の臨床評価がAAにおいて保証されると示唆している。

20

【0160】

D. 材料及び方法

マウス

C3H/HeJマウス株（Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME）を全ての動物試験に使用した。雌マウスのみが使用された。脱毛症皮膚移植片のマウスレシピエントは、移植の時点で7～10週齢であった。予防実験のために、薬物投与は、移植の翌日に開始された。全身治療研究のために、マウスが毛を喪失してから約3ヶ月後に薬物投与を開始した。局所治療研究のために、薬物投与は、移植後20週間に開始した。全ての動物処置は、コロンビア大学メディカルセンター機関動物管理及び使用委員会によって承認されたプロトコルに従って行われた。

30

【0161】

ヒトの研究

全てのヒトの研究は、コロンビア大学医療センターの制度審査委員会の承認を受け、ヘルシンキ宣言の原則のもとに行われた。研究に含める前に、同意書を参加者から受け取った。

【0162】

円形脱毛症における経口ルキシリチニブの臨床的評価

本発明者らは、コロンビア大学メディカルセンターの皮膚科の臨床試験ユニットにおいて、「中等度～重度の脱毛症におけるルキシリチニブの有効性を評価するためのオープンラベルのパイロット試験」と題する単一試験実証実験臨床試験を開始した（clinicaltrials.gov識別子: NCT01950780）。

40

【0163】

この初期パイロット研究の主要な有効性のエンドポイントは、ベースラインと比較して治療終了時に50%以上の再増殖を達成したレスポnderの割合である。二次エンドポイントは、連続変数として測定された治療中及び治療後の両方における育毛の変化；患者の包括的評価；クオリティオブライフ評価；及び治療中止後の応答の持続性；を包含する。

【0164】

組み入れ基準は、SALTスコアで測定した円形脱毛症（AA）に起因する30～95%脱毛；少なくとも3ヶ月の脱毛期間；再増殖について積極的なエビデンスなしに安定し

50

た脱毛；対象年齢 18～75 歳；を包含した。

【0165】

除外基準は、AA 以外の活動的な頭皮疾患；ルキシソリチニブに関連するリスクを増大させるかもしれない診療歴、例えば血液学的、感染性、免疫関連疾患又は悪性腫瘍など；AA 応答に影響を与える可能性のあるいずれのモダリティによる現在の治療；ルキシソリチニブと相互作用することが知られている薬物治療；妊娠；等；を包含した。

【0166】

研究対象者は、少なくとも 3 ヶ月間、経口ルキシソリチニブ 20 mg B I D で処置される。この文書における患者は 90 % 以上の再生を達成した。ベースライン時及び 12 週間の治療後に皮膚パンチ生検（4 mm）を得た。

10

【0167】

マウス処置、フローサイトメトリー、免疫染色及びウェスタンブロット分析に使用される抗体

これらの研究で使用される全ての抗体は、以下の表の形式で列挙される。

【0168】

フローサイトメトリー分析は以下の抗マウス抗体を使用した：CD3（17A2，E b i o s c i e n c e）、CD4（GK1.5，BD）、CD8 α （53-6.7，BD）、CD8 β （YTS156.7.7，B i o l e g e n d）、NKG2D（CX5，E b i o s c i e n c e）、NKG2A/C/E（クローン 20d5，E b i o s c i e n c e）、CD44（IM7，BD）、CD45（30-F11，BD）、CD49b（Dx5，BD）、CD62L（MEL-14，BD）、CD69（H1.2F3，BD）、CD103（2E7，eBioscience）、IFN γ （XMG1.2，E b i o s c i e n c e）、グランザイム B（NGZB，eBioscience）、Rae-1（186107，R&D）。

20

【0169】

マウス皮膚の免疫組織化学的研究のために、8 μ M メタノール固定凍結皮膚切片を、以下のものを包含する一次ラット抗体（B i o l e g e n d）で染色した：抗 CD8（クローン 53-6.7）、ビオチン抗 MHC クラス I（クローン 36-7.5）、抗 MHC クラス II（クローン M5/114.15.2）。ビオチン標識されたヤギ抗ラット IgG（L i f e T e c h n o l o g i e s）を二次抗体として使用した。免疫蛍光研究のために、抗-H60（R&D、クローン 205326）、抗 Pan Rae-1（R&D、クローン 186107）、抗 K G 2 D（R&D クローン 191004）、抗 IL-15（S C B T、H-114）、抗 IL-15 RA（S C B T、N-19）、抗 K71（A b e a m）、一次抗体を免疫蛍光において使用した。A l e x a F l u o r 488 又は A l e x a F l u o r 594 結合 (conjugated) ヤギ抗ラット、ロバ抗ウサギ又はロバ抗ヤギ抗体を二次抗体として使用した（L i f e T e c h n o l o g i e s）。

30

【0170】

ヒトの皮膚の免疫組織化学的研究のために、5 μ M のホルマリン固定及びパラフィン皮膚切片を使用した。熱抗原回収後、皮膚切片を、以下のものを包含する一次抗ヒト抗体で染色した：抗 CD8（A b c a m a b 4055）、抗 CD4（L e i c a クローン 1-F6）、HLA クラス I A B C（A b c a m クローン EMR8-5）、HLA-DR/D P/D Q（S C B T クローン CR3/43）。I m m P R E S S H R P 抗ウサギ Ig 又はマウス Ig（ペルオキシダーゼ）ポリマー（V e c t o r L a b）を二次抗体として使用した。

40

【0171】

ヒト毛包を顕微解剖し、切片化及び染色の前に O C T 化合物に包埋した。8 μ M のメタノール固定凍結切片を、IL-15（S C B T、H-114）及び抗 IL-15 RA（S C B T、N-19）又は抗 IL-15 RB（S C B T、C-20）及び CD8（S C B T、C8/144B）で染色した。続いて、A l e x a F l u o r 488 又は A l e x a F l u o r 594 結合二次抗体（L i f e T e c h n o l o g i e s）で染

50

色した。全ての画像は、SDRC Zeiss Exciter Confocal Microscopeで撮影した。

【0172】

ウェスタンブロッティングのために、処置されたサンプルを4～12%SDSPAGE (Life Technologies)で溶解し(resolved)、次いでWestran PVDFメンブレン(GE Healthcare Life Sciences)に移した。ブロットを、以下の抗体(Ab)(全てCell Signaling Technologiesから)でプローブした：抗ホスホSTAT1(Tyr701)、抗ホスホSTAT5(Tyr694)、抗STAT1及び抗STAT5。

【0173】

in vivo治療のための抗体

【表3】

Antibodies for in vivo treatment

Mouse antibody	Company	Clone	Cat No.
Anti-IL15 R β	Biolegend	TM- β 1	123204
IL-2	BioXcel	S4B6-1	BE0043-1
IL-2	BioXcel	JES6-1A12	BE0043
IFN- γ	BioXcel	H22	BE0254
IL-21	Ebioscience	FFA21	16-7211-85

【0174】

フローサイトメトリー用抗体(1/100希釈)

【表 4】

Antibodies for flow cytometry (1/100 dilution)

Mouse antibody	Company	Clone	Cat No.
CD3	Ebioscience	17A2	17-0032
CD4	BD	GK1.5	560181
CD8a	BD	53-6.7	560469
CD8b	Biolegend	YTS156.7.7	126610
NKG2D	Ebioscience	CX5	12-5882
NKG2A/C/E	Ebioscience	20d5	13-5896
CD44	BD	IM7	553133
CD45	BD	30-F11	552848
D49b	BD	Dx5	553857
Cd62L	BD	MEL-14	553152
CD69	BD	H1.2F3	557392
CD103	Ebioscience	2E7	17-1031
IFN γ	Ebioscience	XMG1.2	11-7311

Pan Rae-1	R&D systems	186107	MAB17582
Granzyme B	Ebioscience	NGZB	11-8898

【 0 1 7 5 】

免疫染色及びウェスタンブロット用抗体（別段記載がなければ 1 / 1 0 0 希釈）

【表 5】

Antibodies for immunostaining and western blot (1/100 dilution unless otherwise noted)

Human antibody	Company	Clone	Cat No.
CD3	Abcam	PS1	Ab699
CD8	SCBT	C8/144B	Sc-53212
CD4	Leica	1-F6	CD4-1F6-L-CE
HLA Class I ABC	Abcam	EMR8-5	ab70328
HLA-DR/DP/DQ	SCBT	CR3/43	sc-53302

【 0 1 7 6 】

【表 6】

Mouse antibody	Company	Clone	Cat No.
CD8	Biolegend	53-6.7	100702
MHC-class I	Biolegend	36-7.5	114903
MHC-class II	Biolegend	M5/114.15.2	107602
H60	R&D systems	205326	MAB1155
Pan Rae-1	R&D systems	186107	MAB17582
NKG2D	R&D systems	191004	MAB1547

10

【 0 1 7 7 】

【表 7】

Mouse/Human antibody	Company	Clone	Cat No.	IF/IHC Dilution
IL-15	SCBT	polyclonal H-114	sc-7889	
IL-15RA	SCBT	polyclonal N-19	sc-1524	
Phospho-Stat1 (Tyr701)	Cell signaling	D4A7	7649	
Phospho-Stat3 (Tyr705)	Cell signaling	D3A7	9145	1/200
Phospho-Stat5 (Tyr694)	Cell signaling	C11C5	9359	1/400
Stat1	Cell signaling	polyclonal	9172	
Stat5	Cell signaling	polyclonal	9363	
K71	Abcam	polyclonal	Ab133817	

20

STAT, STAT5、pSTAT1及びpSTAT5ab'はウェスタンブロットのために1/1000希釈された。

【 0 1 7 8 】

30

IL-15及びIL-15RA染色ブロッキング試薬

【表 8】

IL-15 and IL-15RA staining blocking reagents

Blocking reagent	Company	Cat No.
IL-15	Peptrotech	AF-200-15
IL-15 RA blocking peptide	SCBT	sc-1524 P

40

【 0 1 7 9 】

RNA-Seq分析

HiSeq 2000シーケンサー (Illumina, San Diego, CA) 上で50サイクルにわたってサンプルを配列決定した。RNA-Seqファイルは、ロックフェラー大学ゲノミクスコア施設によって多重分離された(demultiplexed)。サンプルfastqファイルの品質管理は、fastqcを使用して実行した。転写物をiGenomeからUCSC mm9参照ゲノムにマッピングするため、TopHatを使用した。UCSC mm9のこのiGenomeバージョンでパッケージ化されたRefSeq遺伝子注釈が使用された。TopHat bamファイルを、edgeRで、発現差異の

50

下流解析のための入力として使用できるカウントに変換するため、HTSeqパッケージからのhtseq-countユーティリティを使用した。存在しない遺伝子が除去され、そして、下流解析においてゼロ除算を避けるため、1の疑似カウントが加えられた。3つの生物学的複製を有するマッチドペア設計を用いて発現差異がある遺伝子を同定するため、EdgeRを使用した。

【0180】

マイクロアレイ解析

品質管理、前処理

マウスの場合、cDNAサンプルをMouse Genome 430 2.0遺伝子チップにハイブリダイズさせ、及び続いて洗浄し、ストレプトアビジン-フィコエリトリンで染色し、及びHP GeneArray Scanner (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA)でスキャンした。ヒトの場合、増幅したcDNAをヒトゲノムU133プラス2.0遺伝子チップにハイブリダイズさせた。

10

【0181】

マイクロアレイ品質管理及び前処理は、RにおいてBioConductorを用いて行った。3つの実験、

1) 自発性AAマウス対正常マウス、

2) 3つの処置による予防マウス対プラセボ及び擬似手術マウス、及び

3) 2つの処置のための処置マウス対プラセボ、

20

の予備処理を、同じパイプラインを用いて別々に実施した。

【0182】

品質管理はhttp://arrayanalysis.org/のaffyanalysisQCパッケージを使用して実施した。AffyanalysisQCは、R/BioConductorパッケージ、即ち単一スクリプト内でQCを実行するため、affy、affycomp、affypdnn、affyPLM、affyQCReport、ArrayTools、bioDistm biomaRt、simpleaffy、及びyaqc affy、を使用する。RMAの正規化は、各実験群ごとに別々に行った。予防実験にはComBatを用いたバッチ効果補正が必要であった。バッチ、処置及び時点は、各処置群効果を時間とともに一定として処理し、且つ、処理及び時間の両方を反映する群におけるPBSコントロールをグループ化することによりモデル化した。

30

【0183】

マウス皮膚サンプルに対して行われた前処理に加えて、ヒト皮膚サンプルの画像欠陥を補正するため、Harshlightを使用した。

【0184】

データの寄託(deposition)

マイクロアレイ及びRNA-seqデータは、Gene Expression Omnibus (GEO)、受入番号GSE45657、GSE45512、GSE45513、GSE45514、GSE45551及びGSE58573において寄託された。

【0185】

遺伝子シグニチャの同定

発現差異解析(differential expression analysis)

異なる(differential)遺伝子発現の初期分析を、limmaを用いた自発的マウス3×3及びヒト5×5データセットに対して行った。1.5倍率変化(fold change)の閾値及び0.05の未調整のp値。

40

【0186】

無監督の分析

階層的クラスタリングは、閾値abs(logFC) > 1、未調整p値 ≤ 0.05を満たしたヒト5×5由来の363遺伝子及び自発的マウス3×3由来の583遺伝子に対して、クラスタを用いて行った。遺伝子は、中央値に集中し(median centered)、且つ、

50

正規化されていた。類似性尺度として Spearman 順位相関を使用し、そして、列(row) (遺伝子) 及び行(column) (サンプル) のクラスタリングを行うため、平均連結法を使用した。階層的クラスタの可視化は、Java (登録商標) TreeView を使用して行った。自己組織化マップアルゴリズムで同定された「メタ遺伝子」がサンプルによってどのように異なるかを視覚化するため、遺伝子発現ダイナミックインデックス (GED I) 分析を使用した。メタ遺伝子は、サンプルにわたって同様の発現パターンを示し、且つ、2次元グリッド内の単一ピクセルに割り当てられる遺伝子のクラスタである。

【0187】

RT-PCR 検証

RT-PCR を用いて、ヒト及びマウスにおける予測された発現差異のある遺伝子を確認した。2:1 ランダムプライマー (製造業者の指示に従って Oligo (dT) プライマー及び SuperScript III RT (Invitrogen)) の比を使用して、1 本鎖 cDNA (first-strand cDNA) を合成した。qRT-PCR を ABI 7300 装置で行い、そして、ABI 相対定量試験ソフトウェア (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で分析した。プライマーは ABI ガイドラインに従って設計し、全ての反応は、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、250 nM プライマー (Invitrogen) 及び 20 µL 反応体積中の 20 ng cDNA を使用して行った。次の PCR プロトコルを使用した: ステップ 1: 50 °C で 2 分間; ステップ 2: 95 °C で 10 分間; ステップ 3: 95 °C で 15 秒; ステップ 4: 60 °C で 1 分間; ステップ 3 及び 4 を 40 サイクル繰り返す。全てのサンプルを、3 回の独立した実行のために 4 回繰り返し、そして示されているように内因性内部コントロールに対して正規化した。

【0188】

ALADIN スコア

二変量スコア統計を展開するため、IFN 及び CTL シグニチャを使用した。個々のシグニチャ IFN 及び CTL スコアは、ヒト SLE で使用された手順に従って決定された。IFN シグニチャ及び CTL シグニチャを含むように選択された遺伝子のセットは、CTL シグニチャについては CD8A、GZMB 及び ICOS であり、IFN シグニチャについては CXCL9、CXCL10、CXCL11、STAT1 及び MX1 であった。予防マウスのスコアは、偽マウスに関して計算した一方、局所治療実験のスコアは、0 週目の全サンプルに対して計算した。ヒトの研究に基づいて、ALADIN は、毛髪ケラチン (KER) シグニチャを包含するようにさらに拡張された。KER シグニチャを含むように選択された遺伝子のセットは、DSG4、HOXC31、KRT31、KRT32、KRT33B、KRT82、PKP1 及び PKP2 である。経口ルキソリチニブ臨床試験に登録された対象者から得られたベースライン及び 12 週の皮膚生検の場合の ALADIN スコアを、ベースラインにおける健常コントロールと比較して計算した。

【0189】

検定力 (power) 分析

処置に対する応答の分析のために、本発明者らは、処置に応答することが予想される集団 1 (処置群) の真の割合が 0.95 である場合、及び応答が期待される集団 2 (プラセボ群) の真の割合が 0.20 である場合、処置群及びプラセボマウスについて、それぞれ 5 つの群サンプルサイズについて、比率検定力 (power) 計算について 2 つのサンプルの比較を行った。有意水準 $\alpha = 0.05$ において、Barnard の正確な検定を用いて、本発明者らは、2 つの集団の割合が 0.95 及び 0.20 であり、グループのサンプルサイズが各々 5 に等しい場合に、比率の差を検出する片側検定について 0.803 の累乗を計算した。1 実験につき 1 群当たり 5 匹未満の動物が存在するいくつかの例では、統計力を保証するために多数の (multiple) 実験が崩壊した。

【0190】

治療効果の統計的分析

マウスは、脱毛皮膚の移植の4～12週間後に脱毛症を発症することが予想された。コントロールマウスが8週間まで脱毛を示さなかった実験は中止された。予防実験のために、区間打ち切り(interval censored)データについての時間対イベント生存分析を実施した。ログランクテストを実施するため、Rのsurvival及びintervalパッケージを使用した。育毛指数(hair growth index)を算出した。

【0191】

治療実験(図14B)について、時間相互作用による治療が存在するという仮説を試験するため、Rパッケージnpardを使用した。分析は、各処置からの3匹のマウス及び各群からの合計9匹のマウスのプラセボ群を含む3回の反復実験からの育毛指数を用いて行った。F1-LD-F1設計を採用した。JAK1/2i治療対プラセボの場合、相互作用のない仮説、すなわち平行時間プロファイルは、Wald-Type統計及びANOVAType統計値の両方を使用する5%レベルにおいて拒絶される。ここで、p値はそれぞれ 4.40×10^{-21} 及び 3.35×10^{-18} である。JAK3i治療対プラセボの場合、相互作用のない仮説、すなわち平行時間プロファイルは、Wald-Type統計及びANOVAType統計値の両方を使用する5%レベルにおいて拒絶される。ここで、p値はそれぞれ 1.45×10^{-30} 及び 2.42×10^{-21} である。

10

【0192】

全てのマウスは、生存(時間対イベント)分析統計に含められた。リンパ節及び皮膚細胞分析の場合、コントロールマウスと並行して処置後の指示された時点で生検を採取した。IFN- γ 及びIL-2中和実験において、脱毛を示さなかった5匹のコントロールマウスのうちの1匹が写真に含まれていなかった。これらのマウスは、脱毛のモニタリングを継続するために犠牲にされなかったが、皮膚細胞分析の統計的目的のために、これらの未分析サンプルには、処置されたマウスとの厳密かつ控えめな統計的比較を可能にするため、0%CD8+NKG2D+細胞の細胞カウント値が割り当てられた。

20

【0193】

ランダム化は使用されず、実験中又は結果を評価する際に研究者はグループ割り当てに盲目化されなかった。

【0194】

独立した(unpaired)パラメトリックな両側t検定を用いて、治療群と未治療群との間の平均及び頻度の差異を試験した。統計的目的のために、本発明者らは、全ての変動(variances)が各群について同じであると仮定する。

30

【0195】

イベント生存分析までの全ての時間(all time)を実施するため、期間打ち切りログランク(log-rank)検定を使用した。この検定では、正確なイベント時刻がわからないがイベントがある間隔内にあることが分かっているデータを適切に説明する。

【0196】

ノンパラメトリックな縦方向データ分析を用いて、応答x時間相互作用について試験した。これらの方法は、小さなサンプルサイズに特に適している。

【0197】

サンプルサイズ、複製数、及び実験間の統計的試験

40

【表 9】

Sample sizes, number of replicates, and statistical tests among experiments

Figure	n_control	n_exp	experiment	statistic	p-value
1c	3+3+3+3	6+6+6+6	C3HAA/C3H cell counts	t	< 0.0001
1d	2+2+2	5+5+4	C3HAA/C3H skin	t	< 0.0001
1d	3+3+2	4+4+4	C3HAA/C3H lymph node	t	< 0.0001
1f	3	3	primary cell culture	N/A	NA
2b	5	5	α -IFN γ mice with hair loss	log-rank	0.047
2b	5	5	α -IFN γ Skin cell counts	t	0.0228
2e	5	5	α -IL2, mice with hair loss	log-rank	0.048
2e	5	5	α -IL2 Skin cell counts	t	0.0091
2h	5+4+3	5+4+3	α -IL15R β , mice with hair loss	log-rank	1.11E-05
2h	2+2+1	2+2+2	α -IL15R β Skin cell counts	t	< 0.0001
3b	4+6	4+6	JAK1/2i, mice with hair loss	log-rank	0.00041
3c	2+3	3+3	JAK1/2i Skin cell counts	t	0.0003
3c	2+3	4+5	JAK1/2i lymph node cell counts	t	< 0.0001
3g	7	5	JAK3i, mice with hair loss	log-rank	0.0025
3h	2+2	2+3	JAK3i Skin cell counts	t	0.0002
3h	2+2	2+3	JAK3i lymph node cell counts	t	0.0049
4b	3+3+3	3+3+3	JAK1/2i / JAK3i / Vehicle	nonpara.D	Jak1/2i 4.4e-21, Jak3i 1.5e-30
4c	3	3	JAK1/2i / JAK3i / Vehicle Skin	t	Jak1/2i 0.017, Jak3 0.015
4c	3	3	JAK1/2i / JAK3i / Vehicle lymph node	t	Jak1/2i p=0.0297, Jak3i p=0.0908

10

【0198】

20

in vivo研究では、データは累積データとして提供される。上記のように複製数が提供される。例えば、「3+3+3+3」は、3つの実験マウスを包含する4つの別々の実験を指す。in vitro研究のために、実験を3回行った。

【0199】

6. 3 実施例 3

要約

円形脱毛症（AA）は、1.7%の生涯リスクをもつ、米国で非常に頻繁な自己免疫疾患である。しかしながら、AAは皮膚科学において未だに満たされていない必要性であり続けており、治療法は欠けている。ヤヌスキナーゼインヒビターは、ごく最近ではAAを含む、多くの自己免疫状態のための潜在的な治療法として浮上している。本発明者らは、AAについて、有意な毛の再生（regrowth）、並びに同時に起こる皮膚及び血液のバイオマーカーの変化をもたらす、優先的な（preferential）JAK3/JAK1インヒビターである経口トファシチニブクエン酸塩で処置を受けた患者を報告する。本発明者らは、円形脱毛症の有効なトファシチニブ処置は、循環中の血清CXCL10レベルと同様に、皮膚におけるAA関連遺伝子の発現の変化を伴うであろうと仮説した。パンチ生検は、ベースラインにおいて、及び4週間の処置後に採取された。全RNAは、抽出され、逆転写され、増幅され、ビオチン化され、次いでHuman U133 Plus 2.0遺伝子チップ（Affymetrix、Santa Clara、CA）にハイブリダイズされた。ALADINスコアは、ベースラインにおける健常コントロールと比較して、先に記述されたように計算した。トファシチニブ処置の開始前及び4週間の処置後に採取された採取血液（blood draws）からの血清は、製造業者の指示に従ってHuman IP-10/CXCL10 ELISAキット（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO）を使用して、製造者の指示に従ってCXCL10レベルについて評価された。

30

40

【0200】

結果

持続性で中等度／重度のAAを有する40歳の白人女性が、AAに対する経口トファシチニブの有効性を試験するために、オープンラベルパイロット研究に登録された（<https://clinicaltrials.gov/NCT02299297>）。彼女のAAは、登録の5年前から彼女の頭皮上に始まり、1年以内に妊娠の状況（setting）において完全に解決された。出産から数ヶ月後、彼女のAAは斑状の疾患として再発した。局所コルチコステロイド、アントラリンク

50

リーム及び病変内コルチコステロイドによる処置には、限定的な利益があった。彼女のA Aは、全ての体肢、睫毛及び眉毛に斑状の頭皮の波及を伴うまで進行し、臨床試験への彼女の登録まで安定したままであった（図15）。彼女の過去の病歴は平凡なものであり、彼女はA Aの家族歴を否定した。

【0201】

その患者は、1日2回のトファシチニブ5mgを用いて治療を開始した。斑状の再生は1ヶ月目に認められた。2ヶ月及び3ヶ月の処置の後、彼女の頭皮の毛の再生はそれぞれ62.5%及び94%であった。彼女の眉毛及び睫毛の有意な再生が認められた。頭皮の毛の再生は、処置開始後4ヶ月でほぼ完全であった（図15）。有害事象は報告されておらず、彼女の全血球数、全代謝パネル（complete metabolic panel）又は脂質プロファイルにおける検査異常（laboratory abnormalities）もなかった。トファシチニブによる処置の中断は、ほぼ完全な脱毛を結果としてもたらした（図16）。

【0202】

頭皮のパンチ生検（図17）及び血液採取は、血液の採取を行い、遺伝子発現及びバイオマーカーの変化を観察（monitor）するために、ベースラインにおいて、及び4週間の処置後に実行された。A A皮膚において高レベルで見出されるインターフェロン（IFN）誘発ケモカインであるCXCL10の血清レベルは、4週間の処置後に減少した（図17）。加えて、マイクロアレイ解析が皮膚生検サンプルに対して実行された。A A疾患活性係数（ALADIN）に基づいて、患者は、ベースラインにおいて高いIFN及び細胞傷害性Tリンパ球（CTL）シグニチャを示し、それは、正常コントロールのレベルまでではないが、4週間の処置によって低下した（図17）。

【0203】

結論

円形脱毛症は、免疫機能を有する遺伝子に極めて接近した遺伝子座との強い関連性を有する自己免疫疾患である。疾患の病態形成に寄与し得る候補免疫経路を標的とすることは、研究の活発な領域であり、JAKインヒビターは、A Aに関わる複数の免疫シグナル経路を標的とする。本発明者らは、C3H/HeJマウスにおけるA Aの移植モデルにおいて、全身及び局所のトファシチニブが、A Aの発症を予防すること及び確立されたA Aを逆転させること（reversing）に有効であることを、先に示した。本発明者らは、ここで、ベースラインに比較して小さくされたALADINプロファイルと相関する、持続性の斑状A Aを有する人間の対象者の有効な処置を報告する。

【0204】

6.4 実施例4

要約

円形脱毛症（A A）は1.7%の生涯リスクをもつ一般的な自己免疫疾患であり、円形脱毛症（A A）に関してFDAに承認された処置法がない。本発明者らは、ヒト及びマウスのA A皮膚における細胞傷害性T細胞（CTL）内の優勢なIFNg転写シグニチャを先に同定し、JAKインヒビターによる処置は、この経路を標的とすることによってマウスにおいて耐久性のある毛の再生を誘導することを示した。ここで、本発明者らは、中等度から重度のA Aを有する患者の処置における経口JAK1/2インヒビタールキシソリチニブの使用を研究した。

【0205】

本発明者らは、3-6ヶ月の処置にわたって経口ルキシソリチニブ20mg BIDを使用して、中等度から重度のA Aを有する12名の患者のオープンラベル臨床試験を開始し、3ヶ月間のフォローアップ薬物離脱（follow-up off drug）が続いた。主要なエンドポイントは、ベースラインから処置の終了までの毛髪の再生が50%又はそれ以上の被験者の割合であった。

【0206】

12名の患者のうちの9人（75%）が、処置に対する顕著な応答を示し、処置の終了時において92%の平均の毛髪の再生であった。安全パラメータは大部分が正常限度内に

とどまり、深刻な有害作用は報告されなかった。遺伝子発現プロファイリングは、CTL及びIFN応答遺伝子に関するシグニチャを含む、処置に関する炎症性マーカーのダウンレギュレーション、並びに毛特異的マーカーのアプレギュレーションを明らかにした。

【0207】

このパイロット研究において、ルキシソリチニブをもちいて処置された12人の患者のうちの9人(75%)が、有意な頭皮の毛の再生及びAAの改善を示した。AAの処置におけるルキシソリチニブの安全性及び有効性を更に評価するためには、より大きな無作為化比較試験が必要とされる。

【0208】

はじめに

円形脱毛症(AA)は、重要な医学的問題であり、米国で最も頻繁な自己免疫疾患であり、生涯リスクは1.7%である。AAは全ての民族にわたって両性に影響を与え、アンドロゲン性脱毛症のみに次いで、ヒト脱毛症の2番目に最も一般的な形態に相当する。AAは通常、斑状の脱毛を示す。これらの患者の3分の1が、最初の1年以内に自然寛解を経験するであろう。しかし、多くの患者の疾患は、完全脱毛症(AT、全頭皮の脱毛)又は汎発性脱毛症(AU、全身の毛の喪失)に進行するであろう。持続性で中等度/重度のAAは、罹患した個人に対して、有意な外見への影響及び精神的苦痛を引き起こす。臨床上の実践において、AAのためのエビデンスベースの処置は存在しないが、様々な処置が提供されており、最も一般的には局所ステロイド及び病変内ステロイドが提供され、それらは限定的な有効性をもつ。

【0209】

最近の研究は、インターフェロン γ を産生するNKGDを有するCD8+細胞傷害性Tリンパ球(CTL)によって媒介される、AAの病態形成におけるI型細胞性免疫の支配的役割を実証した。I型細胞性免疫の中心的役割はまた、IFN応答遺伝子及びCTLシグニチャによって支配される、ヒト及びマウスにおけるAA病変皮膚の転写状況(transcriptional landscape)にも反映される。これらの知見は、AAにおけるJAK1/2キナーゼを治療的に標的とするための理論的根拠を提供し、実際に、本発明者らは、JAKインヒビターによる処置はC3H/HeJマウスにおいてAAを逆転させ、皮膚におけるI型炎症応答をなくすことを示した。

【0210】

前臨床的知見に基づいて、本発明者らは、中等度から重度のAAにおけるフェーズ2有効性シグナル追求臨床試験を開始し、骨髄増殖性疾患の処置に関して現在FDAに承認されているJAK1/2インヒビターである、経口ルキシソリチニブによる処置に対する臨床的及び免疫病理学的応答を評価した。

【0211】

方法

研究デザイン、監督、参加者

研究は、コロンビア大学の調査チームによって考案され、実施された。全ての著者はデータへのアクセスを持ち、その正確性とこの報告書の研究プロトコルに対する忠実度を証明した。この研究は、ハーモナイゼーションに関する国際会議(ICH)によって規定されるような、優良臨床試験基準(GCP)に従い、且つ欧州連合指令2001/20/E C及び米国連邦規則、タイトル21、パート50(21CFR50)の根底にある倫理原則に従って、実施された。研究開始に先立って、プロトコル及び全ての研究関連材料についてコロンビア大学IRBから承認が得られた。スクリーニング又は研究関連手順の前に、自由に与えられた書面によるインフォームド Consentが全ての被験者から得られた。規則遵守及びIRB承認プロトコルへの固守のための監視は、コロンビア大学臨床試験室及び外科規則チームの部門によって実行された。研究は、開始前にclinicaltrials.govに登録された。本発明者らは、中等度から重度のAA(30-95%の脱毛)を有する10人の患者及びAT又はAUを有する2人の患者を含む、12人の成人

患者を登録した。

【0212】

研究評価及び予後 (Outcomes)

研究の主要な有効性エンドポイントは、標準化され、検証されたAAにおける脱毛を推定するための方法である、脱毛症の重症度ツール (SALT) スコアによって評価されるベースラインに比較して少なくとも50%の再生を達成しているそれらの被験者として定義される、処置の終了時におけるレスポンスの割合であった。副次的な有効性エンドポイントは、連続変数として毛髪の再生を含んでいた。加えて、生活習慣測定 (皮膚科学生活の質指標 - DLQI 及び Skindex) は、規則的な予め指定された間隔で行われたが、実行された比較において統計的差異を示さなかった (データは示されていない)。応答耐久性 (response durability) を評価するために、レスポンスは、処置が完了した後3ヶ月間にわたって追跡された。安全性分析は、少なくとも1回のルキソリチニブの投与を受け、記載されたように毎月の訪問時に観察された全ての被験者に関して、副次的なエンドポイントとして含まれていた。

10

【0213】

除外基準

患者が3ヶ月未満のAAを有する場合；活動的、不安定なAA又は再生するAAを有する場合；毛髪の再生に影響を与える可能性のある (登録に先立って1ヶ月以内に) 併用処置を受けていた場合；又は患者が根底にある感染、悪性腫瘍、免疫不全又は不安定な医学的状态の証拠を有していた場合に、その患者は除外された。また、頭皮上に付随する皮膚疾患を有する患者；又は先月の内又は薬物の半減期の3倍の内に実験的な薬物療法を受けている患者も、除外された。最近又はDMARDs (疾患修飾性抗リウマチ薬) の使用を報告している患者は、除外された。

20

【0214】

有害作用

有害事象は、その事象が研究処置と因果関係を有すると考えられたかどうかに関わらず、治験薬の少なくとも1回の投与を受けた患者における、任意の新しい不都合な (untoward) 医学的な出来事 (徴候、症状又は異常な検査所見)、又は既存の医学的状态の悪化として分類された。有害事象は、毎月の訪問時に評価された。患者はまた、心配な新しい兆候又は症状を発症した場合には、訪問の間に研究センターに接触することも奨励された。数人の患者が最初に白血球数の緩やかな減少を発症したが、レベルは正常限界内に留まり、したがって用量調整 (dose adjustment) は要求されなかった。1人の患者がヘモグロビンレベル低下を発症し、それは用量変更を要求した。血小板数の有意な減少は観察されなかった。1人の患者が、発疹／膿瘍の2回のエピソードを発症した。両方のエピソードは、患者の主治医によって評価され、その患者が調査チームによって評価される前に解決された。同患者はまた可能性のある生検部位の感染を報告し、そのために彼女は医学的な配慮を求め、国外で経口抗生物質による処置を受けたと報告されている。数人の患者は、季節性で薬物とは無関係であると思われる軽度のURIsを発症した。1人の患者は、胸部X線で確認された肺炎の軽度のエピソードを有し、これは経口抗生物質によって処置された。この患者は、研究参加の数年前に肺炎のエピソードの遠い病歴を有していた。臨床的に有意な低下した血小板の発生は観察されなかった。肝臓の異常は認められなかった。1人の患者は、ベースライン時及び処置中に脂質の上昇を有した。彼は、研究薬物に接する間彼の主治医によって監視され、脂質レベルに関連する臨床的に明らかな有害作用を有しなかった。2人の患者は、座瘡又は頭皮の毛包炎と一致する病変を発症した。両方のエピソードは、数週間で解決された。3人の患者は、下痢を含むGI症状を有した。1人の患者は、予め計画された眼科手技に続く結膜出血 (手技の一般的に見られる副作用) 及び一過性の痔核出血を発症した。血小板の循環レベルに付随する変化はなかった。数人の患者は、尿分析／顕微鏡検査で軽度の異常を有していた。1人の患者は、尿路感染症のために処置を受けた。

30

40

【0215】

50

バイオマーカー評価及び臨床相関的研究

生検及び末梢血は、免疫監視及び分子研究のために、ベースライン及び12週間後に得られた。数人の患者は処置の過程で中間の時点で追加的な生検を提供し、1人の患者は24週で追加的なサンプルを提供した。組織標本は固定され、PAXgene Tissue Containersに保存された。全RNAは、PAXgene組織miRNAキットを使用して、臨床試験の過程で採取された皮膚生検標本から抽出された。ライブラリー調製は、Ovation RNA Amplification System V2及びBiotin Encore Kits (NuGen Technologies, Inc., San Carlos, CA)を使用したマイクロアレイ解析のために実行された。続いて、サンプルは、ヒトゲノムU133プラス2.0チップ (Affymetrix, Santa Clara, CA) にハイブリダイズされ、Yale Center for Genome Analysisにおいてスキャンされた。3人の健常コントロールからの皮膚生検から抽出されたRNAのライブラリー調製及びマイクロアレイハイブリダイゼーションは、処置された患者からのサンプルと一緒に合計31のサンプルについて実行された。遺伝子発現解析は、ALADINスコアの計算、遺伝子発現シグニチャの同定のための発現レベルの発現差異解析、主成分分析、及びALADINスコアの統計解析を含んだ。31のサンプルからのマイクロアレイデータは、受入番号GSE80342でGEOに寄託されている。

10

【0216】

マイクロアレイの前処理及び品質管理

20

マイクロアレイの品質管理及び前処理は、RにおけるBioConductorを使用して実行された。品質管理は、<http://arrayanalysis.org>からのaffyAnalysisQCのRスタンドアロンバージョンを使用して実行された。

【0217】

本研究からの31に含まれたサンプルと、加えてGEO受入番号GSE53573からの健常コントロールからの3つの追加的なサンプルは、GC-RMAを使用して一緒に正規化された。Affymetrixプローブセットは、R内に実装されるMAS5アルゴリズムを使用してaffyAnalysisQCによって存在又は不在であると呼ばれた。X又はY染色体上にあったプローブセットIDs (PSIDs)、AffymetrixコントロールプローブセットであったPSID、又はGene Symbol注釈をもたないPSIDは、更なる下流分析のための全てのアレイから除去された。データは、発現レベルについて $\log_2$ (Intensity) を使用して解析された。

30

【0218】

バッチ効果修正は、ALADINスコアの計算のため及び発現差異解析における向上した検定力 (increased power) のために以前のデータセットGSE58573からの3つの健常コントロールサンプルを含めるために要求された。改変されたバージョンのComBat (M-ComBat) は、以前のGEOデータセットからの正常のサンプルを統合するために使用された。GSE58573からの3つの健常コントロールサンプルを現在の健常コントロールサンプルと統合するためにM-ComBatが使用された間、現在のデータセットからのサンプルの発現レベルは、固定されて保持された。M-ComBatは、バッチのうちの1つが基準バッチ (reference batch) として使用されることを可能にする、svaパッケージにおいてComBatが利用可能な機能の実装である。

40

【0219】

ALADINスコアの計算

ALADINスコアは、バッチ修正された発現データを使用して、全34サンプルについて計算された。CTL、IFN及びKRT ALADINスコアは、先に概説された手順に従って決定された。Zスコアは、簡潔に述べると、各PSIDについて正常コントロールの平均及び標準偏差と比較して計算される。各遺伝子のスコアは、その遺伝子へのPSIDsマッピングのZスコアを平均することによって得られる。次いで、シグニチャスコアは、対応するシグニチャに属する遺伝子についてのスコアの計算された平均である

50

。

【0220】

遺伝子発現シグニチャの同定

正常コントロール ($n = 6$) と共にベースラインにおけるルキソリチニブサンプル ($n = 12$) に対する更なる分析を実行するために、P S I D s は、18 サンプルの少なくとも1つに存在すると呼ばれた特徴のみを保持するように、更にフィルタリングされ、36147 個の P S I D s が更なる下流解析のために残った。

【0221】

ルキソリチニブ処置に応答した患者からの、時間 $t = 0$ 及び $t = 12$ におけるペアリングされたサンプルのフィルタリング

Q C の後、r u x o l i t i n i b 治療に応答した、 $t = 0$ 及び $t = 12$ の両方にマイクロアレイデータを有する8人の患者がいた。P S I D s は、16 サンプルのうちの少なくとも1サンプルに存在すると呼ばれた特徴のみを保持するように、更にフィルタリングされ、35563 個の P S I D s が更なる発現差異解析のために残った。

【0222】

発現差異解析

発現差異解析は、B i o c o n d u c t o r の l i m m a パッケージ内に実装された線形モデルを用いて、 $t = 0$ 且つ正常コントロールからのサンプルに対して、及び、レスポonderからの、 $t = 0$ 及び $t = 12$ からのペアリングされたデータに対して実行された。2.0 倍の変化の閾値及び0.05の未調整のp値が使用された。

【0223】

比較は、ベースラインにおけるレスポonderと正常コントロールとの間、レスポonderとベースラインにおける非レスポonderとの間、ベースラインにおける非レスポonderと正常コントロールとの間、ベースラインにおけるレスポonderと12週間の処置におけるレスポonderとの間、並びに、最後に12週間の処置におけるレスポonderと正常コントロールとの間で行われた。

【0224】

$t = 0$ 及び $t = 12$ における6人の健常コントロール及びルキソリチニブ処置患者の主成分分析

主成分分析は、ベースラインにおけるレスポonderと正常コントロールとの間で差次的に発現されたP S I D s からなるレスポonderシグニチャを使用して、ベースライン及び12週間において6人の健常コントロール及びルキソリチニブ処置患者からのサンプルに対して実行された。

【0225】

統計解析

全ての変数は、分布仮定のために検討され、精度及び範囲外の値についてチェックされた。先験的な定義 (priori definition) に基づいて、本発明者らは、処置の終了時のS A L T スコアに基づいて、彼女ら及び／又は彼らがベースラインから50%又はそれ以上の毛髪の再生を経験した場合に、患者をレスポonderとして分類した。本発明者らは、人口統計学的要因の全体的な分布を検討し、レスポonderと非レスポonderとの間の可能性のある差異を調べ、カテゴリー変数についてフィッシャーの正確確率検定 (Fisher's Exact Test) (両側性) を使用し、連続変数についてマン・ホイットニーのU検定 (Mann-Whitney U test) を使用して有意性について試験した。次いで、本発明者らは、マン・ホイットニーのU検定又はウィルコクソン符号順位検定 (Wilcoxon Signed Rank test) のいずれかを採用して、関連する変数全体に対して、及びレスポonder及び非レスポonderについて、ベースライン、処置の終了時 (E O T) 及び試験終了 (E O S) のスコアの間の変化を検討した。時間にわたる再生の程度を推定するために、本発明者らは、反復測定データをモデル化するための一般化推定方程式 (Generalized Estimating Equation) 及び混合モデルアプローチの両方を考慮し、G E E の強い正規性 (normality) 仮定及び比較的小さな例数を前提として後者を選択した。これらの混合モデルについて、本発

10

20

30

40

50

明者らは、ベースラインから処置の終わりまでの再生を最初にモデル化し、ここでは時間（週）が独立変数であった。次いで、本発明者らは、観察された効果の維持を評価するために、処置の終わりから研究の終りまでの再生をモデル化し、ここでも同様に時間が独立変数であった。両方のモデルにおいて、本発明者らは、初期共分散構造として化合物対称性を特定した。

【0226】

A L A D I Nスコアの統計解析

レスポnder及び非レスポnder、レスポnder及び正常コントロール並びに非レスポnder及び正常コントロールにおけるC T L、I F N及びK R T A L A D I Nスコアのそれぞれの間の可能性のある差異を検討するために、本発明者らは、Rにおけるcoinパッケージに実装されるようなウィルコクソン順位和検定 (Wilcoxon Rank Sum tests) が続く、クラスカル・ワリス検定を使用して、3つの群の間の差異について試験した。次いで、本発明者らは、Rにおけるcoinパッケージに実装されるようなウィルコクソン符号順位検定を使用して、レスポnderについて、ベースラインと12週におけるA L A D I N値との間の変化を検討した。本発明者らは、12週におけるレスポnderと正常コントロールとの間の3つのスコアの差異について更に試験した。

【0227】

A L A D I Nスコアは、平均C T L、I F N及びK R Tスコアがゼロに等しくなるように定義され、平均全体（全患者）スコア、レスポnderのみのスコア、及び非レスポnderのみのスコアをもたらし、これらの平均差及び通常のコントロールに対応する。統計的に有意な差異は、ベースラインにおける全体スコア対正常コントロールの間ではC T L ($p < 0.0002$)、I F N ($p < 0.005$) 及びK R T ($p < 0.0002$) スコアにおいて観察され、ベースラインにおけるレスポnderのみ対正常コントロールの間ではC T L ($p < 0.0004$)、I F N ($p < 0.0004$)、及びK R T ($p < 0.004$) において観察され；12週における全体スコア対正常コントロールの間ではC T L ($p < 0.04$) 及びI F N ($p < 0.0004$) において観察され；また、レスポnderのみ対正常コントロールとの間では、アルファ=0.05でK R T ($p < 0.0007$) において観察された。ベースラインにおける全体対正常コントロールにおけるI F Nスコアにおいて；又は、12週におけるレスポnderのみ対正常コントロールにおけるC T L及びI F Nスコアにおいて、統計学的に有意な差は観察されなかった。3つのA L A D I Nスコアのいずれにおいても、ベースラインにおける非レスポnderと正常コントロールとの間に統計学的に有意な差は観察されなかった。

【0228】

ベースラインと12週との間で、個別の患者におけるA L A D I Nスコアの変化が評価された。統計的に有意な差は、全体のベースラインと12週目との間でC T L及びI F Nスコアにおいて観察され、K R Tスコアは限界的有意性 (marginal significance) ($\alpha = 0.05$) に到達しつつあった。C T Lスコアは8.30から1.51に低下し ($p < 0.004$)、I F Nスコアは31.08から-0.37に低下し ($p < 0.004$)、K R Tスコアは-39.36から-15.02に増加した ($p = 0.054$)。レスポnderのみの間では、C T Lスコアは9.37から1.6に低下し ($p < 0.008$)、I F Nスコアは38.37から0.24に低下し ($p < 0.008$)、K R Tスコアは-37.84から-15.42に増加した ($p = 0.039$)。統計的に有意な差は、レスポnderと非レスポnderとの間で、ベースラインにおけるC T L及びI F Nスコアにおいて観察された（平均スコア差=-5.91及び40.11、それぞれ $p < 0.036$ 及び 0.036 ）が、K R Tスコアにおいては観察されなかった（平均スコア差=-19.74、 $p = 0.22$ ）。

【0229】

結果

有効性

本研究は、中程度／重度のA Aの処置において20mg P O、毎日2回のルキシリチニ

ブ (Jakafi, Incyte Pharmaceuticals) を調査するためのオープンラベル臨床試験であった。全ての患者は、3～6ヶ月間にわたったルキシソリチニブを受け、処置応答耐久性を評価するための3ヶ月の観察フェーズが続いた。

【0230】

12人の患者のうちの9人(75%)が、有意な毛髪の再生を有し、少なくとも50%の再生の主要な予後を達成した。65.8±28.0%の平均ベースラインSALTスコアは、3ヶ月で24.8±22.9%のスコアに、6ヶ月の処置の終了時で7.3±13.5%に低下した($p<0.004$)。1つの群として、レスポnderはベースラインから脱毛の92%の減少を示し(図18及び図19)、9人のレスポnderのうちの7人が処置の終了時まで95%以上の再生を達成した。

10

【0231】

再生は、研究投薬が開始された後4週間後すぐにレスポnderに見られ、主に灰色の毛髪の再生を示し、白斑を併発した1人の患者(被験者4)を除いて、色素性末端毛からなる再生の可変性の微妙な斑状の領域として初期的に現れた。注目すべきは、この患者の白斑の領域もまた、ルキシソリチニブ処置で改善することが認められた。全てのレスポnderの毛髪の再生は、毎月の有意な増加で着実に増加し、12週の訪問までにレスポnderの大半(9人中8人)が少なくとも50%の再生を達成することを結果としてもたらした。3ヶ月において再生の証拠を有する応答する患者は、被験者が95-100%の再生を達成するか、又は6ヶ月の処置を完了するまで、処置を継続した。

【0232】

応答の耐久性は、処置から3ヶ月のフォローアップ期間内に評価された。9人のレスポnderのうちの3人は、ルキシソリチニブ投与中止に続いて3週で脱落の開始を認め、投薬から12週で有意な脱毛を有した(図21)；しかしながら、脱毛はベースラインレベルに達しなかった(図18)。9人のレスポnderのうちの6人が軽度の脱落増加を報告した。

20

【0233】

バイオマーカー及び臨床相関的研究

遺伝子発現プロファイリングは、ベースラインにおいて、12週の処置に続いて採取された皮膚生検に対して実行され、処置過程の早期に追加的、選択的な生検が実行された。ベースラインの頭皮サンプルは、罹患していない患者から採取したサンプルに比較された場合に、別個の(distinct)遺伝子発現プロファイルを示した(図20A)。ルキシソリチニブ処置に続いて、AA患者頭皮サンプルは、ベースラインAAサンプルよりも健常コントロール頭皮サンプルに、より密接に集まり、AA病源性応答の全体的な正常化を示した(図20B)。インターフェロン(IFN)、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、及び毛髪ケラチン(KRT)シグニチャに帰する遺伝子発現プロファイルは、AA病源性炎症応答及び毛髪の再生の要約指標である、三変量円形脱毛症疾患活動指標(ALADIN、図20C)で評価された。重要なことに、最終的なAAレスポnderは、ベースラインにおいてALADINマトリックス上に一緒に集まり、高いIFN及びCTLスコアを共有した(図20C、図20D)。

30

【0234】

注目すべきことに、最終的なAA非レスポnderからのベースラインサンプルは、正常コントロールサンプルと統計的に異ならない、比較的低いIFN及びCTLスコアを示した(図20D、図20E)。その上に、記述されたようなルキシソリチニブ処置に関するAA患者のコホートにおいて、CTL及びIFNシグニチャスコアは、ベースラインにおいて最終的なレスポnder及び非レスポnderを区別することができた(CTL及びIFNスコアについて、それぞれ $p<0.036$ 及び $p<0.036$)。

40

【0235】

処置の的確な活動(on-target activity)と一致して、応答する患者から12週間の処置に続いて採取された皮膚サンプルは、はるかに低いIFN及びCTLスコアを示し、ALADINマトリックス上の正常コントロール患者から採取された皮膚サンプルに、は

50

るかに密接に集まった（図20D、図20E）。処置後生検における低下したIFN及びCTLスコアは、早くも処置の開始後2週間で明白であった（図22）。

【0236】

有害事象

ルキシソリチニブは、12人の患者全員において耐容性が良好であり、安全に投与された。深刻な有害作用はなく、治療の中止が要求される患者はいなかった。観察された有害作用はまれであり、（同じ患者における）3つの軽度の細菌性皮膚感染、7人の患者におけるURI／アレルギー症状の9回のエピソード、1例のUTI、1例の軽度の肺炎、軽度のGI症状、及び外科手技に続く1例の結膜出血を含んだ。1人の患者はヘモグロビン低下を発症し、用量変更により解決された。

10

【0237】

考察

この実証実験研究において、3から6ヶ月間、1日2回、20mgのルキシソリチニブは、12人の患者のうち9人において有意な毛髪の再生を誘導し、AAの処置において、ルックスリチニブに対する全体で75%の応答率であった。対照的に、中等度から重度のAAを有する患者における予想される自然寛解率（処置なしでの毛髪の再生の発生）は、類似する被験者集団での2つの無作為化比較試験（randomized controlled trials）に基づいて12%未満である。最も重度の形態の脱毛症、AT／AU、でさえ応答し、自己免疫プロセスが病原的に活性なままであり、JAK阻害によって可逆的であることを示した。毛髪の再生は、レスポnderにおいて1ヶ月以内に明らかであり、急速に進行した。応答は、9人のレスポnderのうちの8人において6ヶ月の処置によってほぼ完了し、大多数のレスポnderにおいて最大の臨床的寛解を誘導するために6ヶ月の治療が十分であることを示唆した。

20

【0238】

この9ヶ月の研究において、ルキシソリチニブは耐容性が良好であった。その他の点で健常なAA患者のこの小規模な研究における安全信号は、特に血液学的関連する有害事象がより頻繁であると理解される、骨髄増殖性疾患を有する患者におけるルキシソリチニブについての従来の臨床経験と比較して優れており、乾癬患者の治療におけるトファシチニブの使用による所見と一致する。

【0239】

ペアリングされたベースライン及び処置中の頭皮生検の転写プロファイリングは、機構的及び臨床的の両方で情報価値があった。レスポnderからのベースライン皮膚サンプルは、高炎症性のALADIN IFN及びCTLスコアを有したが12週間の処置の後にほぼ正常化し、自己反応性CD8T細胞応答のJAK1／2 i 媒介性抑制を示す。事実、処置開始に続いて2週目という早期のALADINの正常化（図22）は、好ましい第12週の臨床予後を予測する可能性がある。逆に、非レスポnderサンプルは、低いベースラインIFN／CTLスコアを示し、正常患者サンプルに対して比較的密接に集まっており、これらの非レスポnderにおける脱毛の代替的な炎症性又は非炎症性の病因を示唆する（図23）。1人の非レスポnderはAAとアンドロゲン性脱毛症の両方を有し、他の非レスポnderの脱毛症は組織学的にAAと一致したが、この疾患のまれな拡散型であると思われ、最後の非レスポnderは蛇行状脱毛AAパターンを示した。

30

40

【0240】

最近の単一症例報告は、トファシチニブ、ルキシソリチニブ、及びバリシチニブを含む他のJAKインヒビターを用いて処置されたAA患者における臨床応答を記載している。これらの実証実験データは、たとえ長期又はより重度の疾患の形態の患者においても、AAの根底にあるI型炎症応答の免疫病理学的可逆性を実証し、AAの処置のための経口及び／又は局所JAKインヒビターの臨床開発のための強力な理論的根拠を提供する。

【0241】

6. 5 実施例 5

要約

50

癌などの複雑な疾患の研究では、生理学的挙動のネットワークベースの分子モデリングが非常に重要であることが証明されているが、これらのアプローチは、自己免疫などの相互作用する組織を含む状況 (contexts) では大部分が未試験のままである。ここでは、円形脱毛症 (AA) をモデルとして使用し、本発明者らは、自己免疫疾患における免疫細胞の動員に寄与する皮膚における生理学的挙動を特異的に分離するために、制御ネットワーク分析を適合させた。本発明者らは、IKZF1 及び DLX4 を主要制御因子 (マスターレギュレーター) (MRs) として、皮膚特異的制御モジュールの畳み込みを解き (deconvolve)、同定するために、状況特異的 (context-specific) 制御ネットワークを使用する。これらのMRsは、3つの培養細胞株において生体外 (インビトロ) でAA様の分子状態を誘導するのに十分であり、誘導されたNKGD依存細胞傷害性をもたらす。この仕事は、自己免疫疾患における組織間の相互作用に寄与する分子挙動を区画化及び標的化するためのネットワークベースのアプローチの実現可能性を実証する。

10

【0242】

はじめに

逆行分析された制御ネットワークを使用したシステムレベルの分析は、癌やアルツハイマー病などの複雑な疾患の研究において大きな有望性を実証した新しい計算規範 (computational discipline) である。このアプローチは、主要制御因子 (MRs) によって制御される遺伝子のモジュール (疾患に関連する示差的に発現する遺伝子のサブセット) としての複雑な生理学的挙動のモデリングを可能にする。MRsは、標的モジュールを特異的に活性化又は抑制すると予測される転写因子 (TFs) の最小限の数、及び、拡張によって、関連する生理学的挙動を表す。それらは、生理学的挙動を調節する分子「スイッチ」とみなすことができる。MRsの推論は、ARACNeのような計算アルゴリズムを使用した状況特異的な制御ネットワークの逆行分析を通じて可能になる。

20

【0243】

これらのMRsは、生物学的に検証され、疾患の病理を支配する標的化可能な「ハブ」として働く。これらのアプローチは、癌などの疾患における細胞自律挙動の研究のために効果が高いと証明されている。グリア芽腫における間葉系形質転換及びB細胞リンパ腫又は乳癌における腫瘍発生、並びにアルツハイマー病の発病などの生理学的挙動は、比較的少数のMRsに機能的につながっており、これは次に患者のドライバー突然変異を推論するために使用され得る「ボトルネック」となるか、又は処置のための薬物スクリーニングの標的となる。

30

【0244】

しかしながら、この種類の計算アプローチは、自己免疫疾患のような、異なる組織間の病原性で非細胞性の自律的相互作用を標的とするために実施され始めているのみである。特に、MRsを推論することは、制御ネットワークの生成の間になされる根本的な仮定のために、典型的なARACNeベースの分析を使用して直接行うことはできない：(1) 使用されるサンプルは比較的純粋であるか、又は一つの根底にある転写ネットワークを表す；及び(2) データセットの根底にある分子挙動は定常状態で存在し、そのため各サンプルはネットワーク全体の中の制御依存性の「スナップショット」として扱われてもよい。特に異なる状況特異的な制御ネットワークを示す組織によって汚染されたサンプルは、制御予報 (predictions) の精度を損ない得る。さらに、病態形成が2つの組織間の相互作用に依存する場合は、汚染遺伝子シグニチャとそれらを動員するが他の組織で発現される分子モジュールとの間のアーチファクト相関が常に存在するであろう。これは、2つの組織の混合物から生成された遺伝子発現データを解析する場合に、1つの組織又は他の組織に独占的なモジュールを明確に定義することを困難にする。

40

【0245】

円形脱毛症 (AA) は、典型的には正常な皮膚には存在しない毛包及び頭皮皮膚に能動的に浸潤する細胞傷害性T細胞によって特徴付けられるので、そのような研究のために理想的なモデルを提供する。AAは、典型的に個別のランダムな斑状の毛髪の喪失として現れ、それは全頭皮 (完全脱毛症) 又は全身 (汎発性脱毛症) に広がる可能性がある。以前

50

の調査は、A Aに免疫遺伝子を直接的に関係させており、それらの多くは1型糖尿病、セリアック病及び関節リウマチなどの他の自己免疫疾患と共有されている。以前の研究は、A Aの皮膚の中への細胞傷害性C D 8陽性、N K G 2 D陽性T細胞の浸潤を同定しており、A Aの病理にはI F Nガンマ依存性シグナル経路が関係しており、それは癌における免疫回避に伴ってしばしば途絶される（disrupted）。

【0246】

A Aにおける頭皮皮膚のような、疾患に寄与する「終末器官（end organ）」（自己免疫攻撃を受ける組織）内に内因子が存在するかどうかを決定し、この分子成分を分析の主要な標的とするための仕事はほとんど行われていない。本発明者らは、頭皮皮膚の分子プロフィールの病原性変化が浸潤T細胞との相互作用を媒介する遺伝子を包含すると予期する。必然的に、M R sを同定することは、免疫動員を誘導するために十分なモジュールへの制御調節を与えるであろう。これを研究するために、本発明者らは、A A患者の混合シグニチャ遺伝子発現プロフィールの制御デコンボリューション（regulatory deconvolution）のために、状況特異的な制御ネットワークを活用する。この仕事の目標は、混合されたA A組織生検遺伝子発現データをA A病理及び浸潤動員の皮膚特異的モジュールに分離することができるフレームワークを開発することであった。

【0247】

本発明者らは、皮膚特異的ネットワークに正確にマッピングされない遺伝子をフィルタリングすることにより、頭皮皮膚における浸潤動員の遺伝子モジュールを含むA Aの分子プロファイルと同定した。この頭皮皮膚シグニチャは、頭皮皮膚の2つのM R s：I K Z F 1及びD L X 4の、浸潤への寄与のその後の同定を可能にした。これらの2つの遺伝子は、主要頭皮生検において発現され、独立した野生型細胞状況においてA A様分子シグニチャ及びN K G 2 D依存細胞傷害性を誘導するのに十分であり、免疫媒介細胞傷害性の直接遺伝的誘導を可能にする。

【0248】

結果

A Aにおける病原性発現シグニチャの初期定義は、局所的な頭皮皮膚及び浸潤免疫シグナルの存在を明らかにする

第1に、本発明者らは、A A患者をコントロールに比較してA Aの分子表現（molecular representation）を生成する分子シグニチャを作成した。本発明者らは、34のユニークな生検サンプルの最初のコホートからの患者生検のマイクロアレイ研究の訓練セットを分析した：様々な臨床プレゼンテーションの21人のA A患者、及び13人の罹患していないコントロール。本発明者らは加えて、21人のA A患者のうちの12人について、患者適合性の（patient-matched）、非病変頭皮生検を行った。これらの34人の患者は、合計で96人の患者の2つのコホートのうちの最初のものとして集められ、その残りは検証研究のために蓄えられた。

【0249】

本発明者らは、2つの個別の臨床プレゼンテーション、斑状A A（A A P）並びに完全及び汎発性（A T/A U）の患者を全て、罹患していないコントロールに対して比較することにより全体的な遺伝子発現シグニチャを作成した。脱毛などの浸潤の二次的影響と関連するシグニチャにおけるアーチファクトを説明するために、次いで本発明者らは、患者適合性の病変（脱毛を伴う症候性の皮膚）サンプル及び非病変（毛髪を持つ非症候性の皮膚）サンプルのセットに対する、この遺伝子シグニチャを使用した階層的クラスタリングを実行した。この分析は、これらのサンプルの間で差次的に発現された遺伝子クラスタ、並びに、病変サンプル及び非病変サンプルにわたって全身的に同等（systemically equivalent）であった遺伝子クラスタを同定した。本発明者らは続いて、第1の発現セットから、病変対非病変の状態と相関するクラスタに分類された任意の遺伝子を除去した。これは主に、ケラチン及びケラチン関連タンパク質のかなりの数（ただし全てではない）をシグニチャから除去した。

【0250】

結果として得られる遺伝子発現シグニチャである円形脱毛症遺伝子シグニチャ (AAGS) は、合計 136 個のユニークな遺伝子から成り (表 A)、全訓練コホートを、コントロール及び疾患状態に対応する 2 つの適切なスーパークラスタにクラスタ化するために十分な情報を提供した (図 24A)。同時発現によってこれらの遺伝子をクラスタ化することはまた、疾患状態において上方制御された遺伝子において、同時発現のより大きな多様性を伴い、2 つの個別の遺伝子のモジュールを明らかにした (図 24B)。罹患した患者と罹患していない患者との間で差次的に発現された遺伝子の定性的尺度として、本発明者らは、機能予測エンリッチメント (functional annotation enrichments) についてそれらを分析した。この分析は、罹患した患者サンプルにおける HLA 遺伝子、免疫応答要素、並びに炎症及び細胞死経路遺伝子発現の存在を明らかにした (図 24C)。AAGS の 2 つの最も有意なスーパークラスタは、膜貫通シグナルペプチド ($p = 2.8 \times 10^{-11}$) 及び分泌型細胞間シグナルペプチド ($p = 2.1 \times 10^{-10}$) であった。予想されるように、このリストはまた、AA 及び自己免疫疾患に関連するいくつかの抗原提示要素及び免疫応答要素も含む (図 30)。これらの結果は、AA 提示細胞において複数の生物学的プロセスの有意な変化があることを示す。本発明者らは、これらの遺伝子のいくつかのサブセットが頭皮皮膚から生じ、浸潤動員を誘導するために要求されると推論する。

【0251】

予めフィルタリングされなければならない；さもなければ、それらが皮膚特異的分子プログラムと同定を混乱させる可能性がある、浸潤性免疫細胞に由来する免疫関連遺伝子についての有意な証拠もある。免疫細胞又は免疫応答と関連する遺伝子マーカーは、CD8a、CXCL9/10 及び CCL5/18/20/26 を含む AAGS の一部として検出された。一次患者の生検サンプルにおいて、AA に寄与する皮膚特異的分子挙動を定義することは、AA 皮膚サンプルにおける浸潤性 T 細胞及び二次応答経路の存在のために困難な作業である。

【0252】

AAGS の皮膚及び免疫シグニチャを制御モジュールにデコンボルブするための制御ネットワークの活用

疾患シグニチャの明確な定義により、本発明者らは、AAGS の皮膚分子プログラムを、浸潤性免疫細胞に由来する分子プログラムから、全身的で偏りのない様式でデコンボルブしようとした。先験的知識及び潜在的にあいまいな予測に依存する GO 経路エンリッチメント又は他の予測ベースの方法を使用するよりはむしろ、本発明者らは代わりに、皮膚特異的な制御ネットワークにマッピングされることができない遺伝子を同定することによって本発明者らは非皮膚 (免疫浸潤) 遺伝子発現をフィルタリングすることができるという仮説の下で、推論される制御ネットワークを利用する。

【0253】

頭皮皮膚の転写制御ネットワークは、ARACNe アルゴリズム及び関連するソフトウェアスイート (実験手順を参照) を使用して生成された。具体的には、ネットワークを生成するために、本発明者らは、正常 (罹患していない) 全皮膚生検、並びに、T 細胞浸潤をほとんど又は全く含まない、一次培養真皮線維芽細胞及び真皮乳頭細胞のいくつかのサンプルからなる、106 の一次頭皮皮膚サンプルのコホートを含めた。このネットワークは、非浸潤皮膚由来組織における制御ネットワークを表し、図 25 に詳しく示されるように 2 つの主要なステップにおいて起こるデコンボリューションの基礎として働く。

【0254】

制御モジュールのデコンボリューションのために、AAGS 中の遺伝子は、制御ネットワークに直接マッピングされる (図 25A；詳細は実験手順を参照)。AAGS 中の遺伝子は、皮膚 ARACNe ネットワーク (赤色、実線のエッジ) の制御ロジックを使用して、それと TF との間に直接的な調節相互作用がある場合にのみ保持される。ユニークに浸潤性免疫細胞から由来する遺伝子は、ARACNe ネットワークに有意な表現を持たず、続いて皮膚についての AAGS (黒色、点線のエッジ) から除去され、免疫遺伝子シグニチャ (IGS) に加えられる。

【0255】

I G Sは、癌免疫浸潤を特徴付ける以前の仕事から適応された「陰性コントロール」シグニチャとして使用された。そのシグニチャは、T細胞、B細胞、肥満細胞及びマクロファージを含む各免疫細胞型において特異的に発現する遺伝子のセットとして定義された。このステップは、非浸潤制御ネットワーク(A A G S)によって制御が説明され得るそれらの遺伝子を、できないもの(I G S)から分離することによって、A A G S及びI G Sを反復的に再定義する。拡張によって、本発明者らは、正確な皮膚特異的レギュロン(regulons)を生成するために、皮膚遺伝子発現において、フィルタリングされたA A G Sが十分にエンリッチされることを予想した。

【0256】

図25Bに示されるように、皮膚特異的制御ネットワークを通過させられた場合に、A A G Sから13個の浸潤特異的遺伝子が除去された(全シグニチャの9.5%)。これらの遺伝子は、表Aにも列挙されている。これは、2つの相互に排他的な遺伝子モジュール(重複遺伝子なし、 $p = 1.77 \times 10^{-4}$)、A A G S及びI G Sをもたらした。続く経路エンリッチメント分析は、「T細胞活性化」及び「免疫応答」カテゴリーの統計的エンリッチメントの喪失を更に確認し、一方では既知の皮膚免疫応答要素(H L A遺伝子など)を含む他のクラスタを保持した。これは、終末器官に開始される免疫動員及び免疫応答を含む、本発明者らがA A 病理に関連する全ての終末器官プログラムを表すと解釈する、A A G S中の合計123の遺伝子を残した(表A、星印項目)。

【0257】

本発明者らは、免疫細胞(例えば、C D 8 a)に関連する注釈と、免疫応答遺伝子(例えば、H L A)に関連する注釈とを区別したことに留意されたい。前者は、皮膚の制御ネットワークに表されていない制御ネットワークによって除去される。後者は、皮膚における応答要素を表し、疾患の病理に関連するので、発明者が保持しようとするシグニチャ遺伝子である。

【0258】

フィルタリングされたA A G Sをクラスタ化することは、罹患していない患者(図25B、第2)からA A 疾患状態(図25B、第3図)への移行を定義する2つの別個の分子モジュールを明らかにした。各ノードはシグニチャ内の遺伝子を表し、そのサイズは各状態における相対的な発現を表す(より大きいことは、より高い発現を意味する)。本発明者らは、これらの遺伝子群を標識した：(1)疾患状態に移行するときに発現が増大する遺伝子、及び(2)上記の移行において発現が失われる遺伝子。このフィルタリングされたA A G Sは、終末器官特異的遺伝子モジュールを反映し、MR解析への入力として働く。

【0259】

I K Z F 1及びD L X 4は、皮膚A A G S及び、拡張によって、浸潤動員のMRである次のステップは、終末器官特異的MRsを同定する上で最も重要である。本発明者らは、頭皮皮膚制御ネットワーク(図25C、第1、赤色の輪郭線)を使用して、デコンボリューションされたA A G S及びI G Sの両方について、独立かつ並列にMR分析を実行した。皮膚に表される調節相互作用のみを使用して、本発明者らは、デコンボリューションされたA A G S(赤色の矢印)について最も高い特異性を有した転写制御因子を同定し、I G S(黒色の矢印)についての分析を繰り返した。このステップは、遺伝子発現の直接的なカバレッジとは対照的に、頭皮皮膚における制御ロジックに関してA A G SをI G Sに対して比較する。この分析は、皮膚に特異的な分子制御ネットワークを使用して、いずれのT F sがデコンボリューションされたA A G Sのための(I G Sのためではない)最良の候補であるかを評価する。本発明者らは、A A G Sカバレッジにおいて有意であり、I G Sカバレッジにとって有意でない両方の候補のみを保持することによって、皮膚特異的候補MRsを同定する。

【0260】

特異的にA A G Sのために有意な候補MRsのうちで、本発明者らは、A A G Sのカバレッジを最大化するために必要とされる制御因子の最小限の数を同定するために貪欲ソー

10

20

30

40

50

ト (greedy sort) を採用した。本発明者らは、2つのMRsがAAGSの $>60\%$ をカバーするために十分であったことを見出した：IKZF1及びDLX4。任意の追加的な候補は、統計的に有意でないマージン ($<5\%$) でカバレッジを押し上げた。本発明者らは、最大のAAGS忠実度 (発現シグニチャの最も忠実な再現) 及び効率 (必要な最小の制御因子) は、これら2つの遺伝子 (IKZF1 $p=4.17 \times 10^{-4}$ 及びDLX4 $p=4.8 \times 10^{-10}$ 、FDR修正) を通じて達成され得ると結論する。

【0261】

IGSモジュールについて実施された同等のMR分析は、頭皮皮膚制御ネットワークを使用して統計的に有意又は意義のあるMRsを生成できなかった。具体的には、AAGS、IKZF1及びDLX4のための最良の候補は、統計的に無関係まで落ちる (それぞれ第1及び第2から第159及び第210まで低下する、FDR=1) (図25C、IGS・FDR)。デコンボリューションを用いずにAAGSについてMR分析を行うことは、MRに正確にマッピングされ得ず、それにも関わらず分析におけるエンリッチメントには不利になるシグニチャ中の混入遺伝子の存在により、(p値及びシグニチャカバレッジの両方において) 典型的に期待される閾値でMR候補を生成することができない。

【0262】

これらの2つの候補は、この方法を使用して離れてデコンボルブされた (deconvolved away) 如何なる免疫特異的制御モジュールからも別個の、特定の組織状況 (頭皮皮膚) 由来の調節相互作用を使用してAAGSを再現するために要求される制御因子の最小の数を表す。したがって、IKZF1及びDLX4は、AA病態形成に寄与する頭皮皮膚における遺伝制御モジュールを表し (図25C、最後)、AA様の様式で浸潤動員を誘導するために十分であり得る。

【0263】

それが免疫系の外側の細胞において役割を有し得ることは前例がないことはないものの、IKZF1はよく確立されたT細胞分化因子であるため、IKZF1の同定は予想外であった。しかしながら、この分析は、IKZF1のようなMRがAA病態形成に寄与するT細胞に何の役割も持たないことを意味せず、むしろ、IKZF1は頭皮皮膚において追加的に機能して組織間の相互作用を媒介するという有意な証拠があることを留意することは重要である。

【0264】

IKZF1及びDLX4の発現は、正常な毛嚢胞乳頭及びヒトケラチノサイトにおいてAAGS様シグニチャを誘導する

機能的研究によるMR予報を検証するために、本発明者らは、皮膚由来細胞株及び培養細胞においてIKZF1及びDLX4を外因的に過剰発現させ、AAGSの発現に影響することにおける十分性を試験した。本発明者らは、培養細胞における外因性発現のためにDLX4及びIKZF1の2つのアイソフォームをクローン化した。活性IKZF1アイソフォームは研究の実験アームとして働き、一方でDNA結合ドメインを欠くアイソフォームは陰性コントロール (IKZF1 δ) として含められた。本発明者らは、培養初代ヒト毛嚢胞乳頭 (hUDP) 及びヒトケラチノサイト (HK) においてこれらの遺伝子を発現させた。この実験系は、我々が、2つの別個であるが関連する仮説を直接的に試験することを可能にした：(1) IKZF1及びDLX4は、免疫細胞のAA様動員を誘導することができる、(2) それらは、(免疫浸潤物ではなく) 皮膚における発現を通じて、それを行う。

【0265】

本発明者らは、両方の細胞型にわたるIKZF1及びDLX4形質移入 (transfections) において、同じ方向に有意に差次的に発現された遺伝子のセットを同定した。これらの転写産物に基づく全てのサンプルの無監督階層的クラスタリングは、IKZF1 δ 及びRFP (赤色蛍光タンパク質) コントロールからのIKZF1及びDLX4形質移入のきれいな共分離 (co-segregation) を明らかにする (図26A)。その上に、本発明者らは、これらのスーパーグループ内のサブクラスタリングは使用された細胞型に基づいて偏っ

ていない（HKはHKとクラスタ化せず、DPはDPとクラスタ化しなかった）ことを観察し、本発明者らがMR過剰発現の状況非依存性の効果を同定したことを支持する。興味深いことに、本発明者らは、DLX4形質移入がIKZF1転写物及びタンパク質のレベルの上昇をもたらしたのに対し、IKZF1形質移入はDLX4発現に影響しないことを観察した（図26B及び図26C）。

【0266】

続いて本発明者らは、遺伝子セット濃縮分析（GSEA）を使用して、AAGS遺伝子を濃縮について発現データを調べた。本発明者らは、IKZF1形質移入対RFPコントロール及びDLX4形質移入対RFPコントロールを比較する、2つの差次的遺伝子発現研究を実行した。結果は、そのMRsの異所性発現の後に、AAGSの誘導において有意なエンリッチメントが続くことを示す（IKZF1 $p = 0.012$ 及びDLX4 $p = 2.08 \times 10^{-4}$ ；図26D及び図26E）。

【0267】

IKZF1及びDLX4の発現は、正常な培養皮膚においてNKGD媒介細胞傷害性を誘導するために十分である

IKZF1及びDLX4の過剰発現は、これら2つの遺伝子が、HK及びhuDPに適用された場合にAAGSを媒介することができるMRsであることを示唆する。しかしながら、自己免疫及び免疫浸潤に対するこれらのMRの機能的関連性は、それらの発現が標的化された自己免疫応答を誘導するために十分であるかどうかである。これを生体外（*ex vivo*）で調査するために、本発明者らは、末梢血単核球（PBMCs）に曝露された場合のHK細胞及びhuDP細胞における細胞傷害性細胞死のレベルを測定する実験を実行した。

【0268】

本発明者らは、4つの発現構築物：IKZF1、DLX4、RFP（陰性コントロール）又はIKZF1 δ （陰性コントロール）のうちの1つを用いて、HK細胞及びhuDP細胞の両方を再度形質移入した。形質移入の24時間後に、これらの細胞は、新鮮な精製PBMCsと共にインキュベートされた。本発明者らは、ヒト皮膚線維芽細胞及び自己（*autologous*）健常ドナーPBMCsを追加的に培養した。PBMCsは、AA又は他の自己免疫疾患の病歴のない健常コントロール被験者から得られた。

【0269】

全ての比較において、本発明者らは、IKZF1及びDLX4の形質移入について、RFP及びIKZF1 δ コントロールと比較して、PBMC依存性細胞傷害性の統計的に有意な増大を観察した（図27、中央の柱、全体のバー高さ）。患者適合性のPBMCs及びRFPコントロール形質移入された線維芽細胞は、健常標的細胞において予想されるように、細胞傷害性相互作用の証拠を示さなかった（図27A、中央）。しかしながら、IKZF1及びDLX4の導入は、これらの以前には相互作用していない細胞の間に相互作用を誘導するために十分であり、全体の細胞障害性の有意な増加をもたらした。同様の様式で、huDP細胞（図27B、中央）及びHK細胞（図27C、中心）の両方が、PBMCに対する細胞障害性感受性において、バックグラウンドレベルより高い有意な増大を示した。

【0270】

本発明者らはAAにおけるあり得る病原性免疫細胞がCD8+NKGD+活性化T細胞であることを以前に示したので、本発明者らはまた、NKGD依存性相互作用を防止するためにNKGD遮断抗体（実験手順参照）を添加して全ての処置を実行した。全ての場合において、本発明者らは、NKGDの遮断が、IKZF1処置及びDLX4処置の両方における細胞傷害性を、コントロールに匹敵するレベルまで抑制したことを観察した（図27、中央、灰色のバー）。インヒビター処置細胞と未処置細胞との間の差異から、本発明者らは、NKGD依存性である細胞傷害性（図27、中央、白色のバー）を推論することができ、それは、相対倍率変化分析のためにコントロールにおいて観察されるものに対して正規化されることができる。NKGD遮断から、本発明者らは、全ての試

験わたって、I K Z F 1 及び D L X 4 形質移入において特異的に統計学的に有意な増大を観察した（図 2 7 右）。コントロールの形質移入と比較し再び有意な細胞傷害性を示さなかった。N K G 2 D 非依存性細胞傷害性における統計的に有意であるが小さい（ $< 10\%$ ）増大にも関わらず、両方のコントロールと比較して、N K G 2 D 依存性細胞傷害性において約 2 倍から 8 倍の増大があった。本発明者らは、これらの実験から、I K Z F 1 及び D L X 4 は、正常な P B M C s との N K G 2 D 依存性相互作用を誘導することができ、それは、正確な組織型に関係なく形質移入された細胞の毒性をもたらすと結論する。

【0271】

重要なことに、これらの実験は、外因性修飾が厳密に正常培養細胞に対して行われ、自己免疫疾患の病歴のない供給源からの健常 P B M C s に対して曝露されたため、浸潤細胞とは対照的に、頭皮皮膚における I K Z F 1 及び D L X 4 のための細胞自律機能を確立する。

【0272】

MR 発現は、浸潤動員の方向性皮膚特異的 MR モジュールの再構築を可能にする

I K Z F 1 及び D L X 4 が A A G S を誘導するために十分であることを確立した後、本発明者らは、このデータを使用して A A MR モジュールを完全に再構築しようとした。本発明者らは制御が T F M a t h E q T であると推論することができるので、A R A C N e は、T F と潜在的標的（T）である非制御遺伝子との間の直接的な転写依存性を検出することができる。A R A C N e は、T F - T F ペアの間の方向性の相互作用を推論することができず、T F s の制御等価性により、その後に M R s の二次 T（secondary T）を推論することができない（図 2 8 A、最初）。しかしながら、本発明者らは特異的 M R s を用いて H K s 及び h u D P s を直接的に攪乱したので（図 2 8 A、アスタリスク）、本発明者らは、遺伝子発現データを用いて方向性を推論することができる。もし T F B が M R（T F A）の T であるならば、そのとき T F A の過剰発現は T F B の差次的発現をもたらすであろうし、本発明者らは T F A M a t h E q T F B であると推論することができる。続いて、T F B に関連するシグニチャ中の任意のマーカー遺伝子は、二次 T として M R に関連付けられることができる T F A M a t h E q T F B M a t h E q T（図 2 8 A、上）。もし T F B が M R の上流で機能するか又は M R と並行に機能するならば、そのとき T F B 及び T の発現は、T F A の過剰発現によって影響されないであろう（図 2 8 A、下）。

【0273】

この論理を使用して、本発明者らは、これらの細胞状況において I K Z F 1 及び D L X 4 を過剰発現させることによって得られるカバレッジの全範囲を測定するために、制御モジュールを再構成した。本発明者らは、（1）実験において I K Z F 1 / D L X 4 発現に応答し、（2）制御モジュールへの A R A C N e によって、発現された M R との相互情報を有すると予測される、両方の、T F s の任意の下流 T をマッピングした。本発明者らは、応答する A A G S の 78% が、これらの基準に基づいて M R s I K Z F 1 及び D L X 4 からの下流の分離の 2° 以内にあることを見出した（図 2 8 B）。

【0274】

I K Z F 1 及び D L X 4 は、独立したコホートにおける免疫浸潤及び疾患重症度の両方を予測するために使用され得る

このモジュールの検証として、本発明者らは、元の A A アレイコホートに戻り、機械学習分析を実行した。本発明者らは、推測された I K Z F 1 及び D L X 4 活性のみを使用して、検証 A A セットをコントロールと罹患したサンプルに分類することを試みた。図 2 4 からの初期の訓練セットを用いて、本発明者らは、二次元：I K Z F 1 のコンセンサス活性（x 軸）及び D L X 4 のコンセンサス活性（y 軸）の検索空間にサンプルを配列した（実験手順を参照）。訓練セットから、本発明者らは、コンセンサス活性空間の地形図（topographical map）を生成し、コントロールサンプル、斑状 A A 及び A T / A U サンプルに関連する I Z K F 1 及び D L X 4 活性の範囲を定義した（図 2 8 C、黒色の線）。プロットの原点に最も近い図 2 8 C 内の領域は、最も低い複合された I K Z F 1 及び D L X 4

10

20

30

40

50

の活性を表す；その上限（下方の黒色の線）は、コントロールと全てのA A患者との間の差を最大化するサポートベクタマシン（SVM）マージンである。次の上限（上方の黒色の線）は、A A PからのA T/A U患者の分離を最大化するSVMマージンを表す。

【0275】

MR活性のこれらの尺度を使用して、本発明者らは、検証セットに目を向け、患者及びコントロールを分離する際のこれらのパラメータの予知力について試験した。本発明者らは、臨床的重症度に加えて、サンプルを疾患状態とコントロール状態とに分離する強い能力を観察した（図28C、上、 $p < 1 \times 10^{-5}$ ）。各患者サブグループの重心マップ（centroid map）は、コントロール（NC）からA A P及びA T/A Uへの患者群の移行が、相対的なI K Z F 1及びD L X 4活性によってどのように反映されるかを、より明確に明らかにする（図28C、下）。比較のために、本発明者らはまた、訓練セットに含まれていない、A A P非病変サンプル生検についての重心を含めた。

【0276】

独立した炎症性皮膚疾患に適用されたデコンボリューションは、既知の遺伝子を同定する

比較のために、及びアプローチの一般性についての概念実証を提供するために、本発明者らは、アトピー性皮膚炎（A D）及び乾癬（P s）についての公に利用可能な遺伝子発現データセットをダウンロードした。本発明者らは、A A分析と同様に、病変生検を罹患していない生検と比較することにより、各疾患について遺伝子発現シグニチャを生成した（図29A及び31）。A A、A D及びP sシグニチャ内の遺伝子の直接的な比較は、A A G SがA D及びP sの両方から別個のものであるという統計的に有意な証拠を明らかにした（それぞれ、 $p = 0.003$ 及び 3.93×10^{-13} ）。対照的に、A Dシグニチャ及びP sシグニチャの互いへの比較は、共有された分子シグニチャ、及び、拡張によって、可能な共有された分子病理についての統計的に有意な証拠が明らかにした（ $p = 0.0173$ ）。

【0277】

これらの2つのシグニチャは、パイプラインに適用された。図29Bは、適切な疾患シグニチャ（P s又はA D）のそれらの総カバレッジによってランク付けされた、分析後に同定された上位5つのMR sを報告する。また、対応するデコンボリューションされたI G Sを使用したMR sのランクも提供される。これら結果は、A Aに関連する重要な制御ハブ（特にI K Z F 1及びD L X 4）が、A Aに特有であることを示す。各疾患には、それ自体のユニークなMR sのリストが割り当てられたが、追加的に、A D及びP sにおける2つの候補MR s：S M A D 2及びH L T Fの重複もあった。S M A D 2及びT G F B R 1は、P sにおける関与の公表された証拠があるTFであり、パイプラインは、P s遺伝子発現シグニチャの基本的な定義を用いて、先験的な証拠なしにそれらを同定することができた。これらの結果は、病理のメカニズムを識別するための制御モジュールとして複雑な遺伝的挙動をモデリングすることの有効性を実証する。

【0278】

考察

ゲノムワイドなプロファイリングを利用する遺伝子調節ネットワーク及び遺伝子発現データの全身生成及び分析は、複雑な疾患の研究の手段になっていることが証明されている。機能的相互作用を調べるための統合的プロジェクトは、最近、糖尿病及びアテローム性動脈硬化症におけるゲノムワイドな発現シグニチャ逆畳み込み（deconvolution, デコンボリューション）及び組織間（cross-tissue）相互作用に活用されている。これらの研究は、病気に関連する病原性免疫浸潤のタイプについての洞察を提供する浸潤遺伝子シグニチャを同定する上で非常に貴重であった。また、これらの研究は（they）、癌やアルツハイマー病の研究で開発されている系統的アルゴリズムと同様に、相互作用する組織の調節活性や組織レベルの遺伝子パネルについて有意なゲノムレベルのカバレッジを提供することにより、e Q T Lやその他のゲノム関連試験からドライバ遺伝子を同定するのに役立った。

【0279】

しかしながら、特にAAのような文脈では、遺伝子発現プロファイル内の個々の病原性分子挙動のモジュラー調節を特徴づけること、及びそれらが疾患の組織間の生理学的相互作用にどのように翻訳するかを特徴付けることはほとんど行われていない。MRによって制御される遺伝的プログラムとしての生理学的形質のモデリングは、複雑な疾患の研究におけるユニークで強力な視点を提供する。このアプローチは、大きな遺伝子発現シグニチャを、比較的少数の選択されたMRに方向づけ、前記MRは(that)、続いて遺伝子治療又は薬物及び小分子を介した操作のTになる。

【0280】

ここで、発明者らは、様々な皮膚の状況（浸潤及び正常）の調節ネットワークを比較することによって、AAにおける組織の終末器官（頭皮）及び浸潤（免疫浸潤）組織の混合サンプルの複雑な分子状態を調べるために調節ネットワークの適用を拡張する。本発明者らは、分子表現型スイッチを支配する重要な制御ハブを同定するためのそれらの典型的な使用に加えて、これらが独立した状況依存ネットワークで正確に表現されているかどうかに基づいて、異なる組織に由来する分子挙動を単離し、及び区画化するために、これらのネットワークを使用することができることを確立する。これは、免疫浸潤のような統合された相互作用的生理学的挙動に寄与する混合サンプルから組織特異的分子プログラムをより正確に同定することを可能にする。このパイプラインを使用して、本発明者らは、AAの文脈だけでなく皮膚からの浸潤を媒介するMRを再構築することができたが、Ps及びADの分析は、一般的に炎症性皮膚疾患の遺伝子調節のための追加の候補を提供し、且つ、このアプローチの一般的な適用性を実証する。

【0281】

AA病理における直接の影響とは別に、この研究は、2つの重要かつ一般化可能な概念の原理の証明を提供する：（1）2つの組織間の複雑な相互作用は、定量化可能な分子遺伝子発現モジュールとしてモデル化することができる；並びに、（2）これらのモジュール及びそれらの調節因子は、発現データから抽出され、組織に区画化され、且つ、正常細胞型において関連する相互作用を誘導するように選択される。これは、MRs IKZF1及びDLX4の異所性発現時にAAGSを再現し、その後、終末器官自体内のIKZF1及びDLX4発現の操作のみを介して正常（非AA）PBMCを使用して、非AA細胞系において増強された細胞毒性を誘発する能力によって立証された（PBMCの遺伝子操作なし）。

【0282】

具体的には、この分析は、頭皮でのみ発現された場合に免疫細胞との相互作用を誘導するのに十分であるMRを同定した。健常なAA未罹患患者由来のサンプルとの患者適合状況においてさえ、IKZF1及びDLX4発現は、皮膚線維芽細胞とPBMCとの間の異常なNKG2D依存性相互作用を誘導して細胞毒性を引き起こすのに十分であった。これらの相互作用はコントロール形質移入には存在せず、且つ、IKZF1又はDLX4の発現が特定の組織又は宿主の一致にかかわらず正常な免疫細胞との相互作用を誘導するのに十分であることを示す、2つの他の（非患者適合性）細胞型で繰り返された。元のAAGSに浸透しているシグニチャの有意な存在が候補MRのいずれの正確な同定を妨げてしまったため、IKZF1及びDLX4の同定はネットワークベースのデコンボリューションなしでは不可能であったであろう。代わりに、ネットワークベースのデコンボリューションは、AA自体とは完全に独立したいくつかの分子状況のいずれかにおいて特定の分子相互作用を誘導することができるMRを同定した。

【0283】

IKZF1はT細胞分化の文脈で広く研究されているので、IKZF1の同定は予想外であった。しかし、その同定は、皮膚由来の規制論理を使用して、IGSではなく、デコンボリューションされたAAシグニチャを使用することからのみ得られた。本発明者らが、遺伝子発現データをフィルタリングするための公開データベース、以前の文献、又はGO注釈に依拠していたならば、本発明者らは、T細胞分化因子としての広範な注釈のため

に I K Z F 1 を完全に無視して除去したであろう。そうではなく、制御ネットワークに目を向けることによって、本発明者らは、I K Z F 1 の局所発現は、免疫細胞においてその確立された役割とは直接には無関係に、病原性関連性を有する可能性があるという可能性を同定することができた。

【0284】

I K Z F 1 は免疫細胞の文脈において十分に特徴付けされているが、免疫細胞外での I K Z F 1 の役割は文献において前例がないわけではない。I K Z F 1 遺伝子座及び D L X 4 遺伝子座の喪失は、結腸直腸癌、肺癌及び乳癌における腫瘍形成及び低悪性度扁平上皮内病変にも関連する。これらの研究は、腫瘍塊から直接ゲノム情報を取得し、これら2つの遺伝子座の体細胞喪失(somatic losses)が最終臓器のゲノム改変として癌病態生理に寄与し得ることを示している。免疫浸潤を誘発するMRとしてのI K Z F 1 及びD L X 4 の研究は、これらの結果を支持し、且つ、これらの遺伝子座の喪失が癌における免疫回避に寄与する可能性を高める。さらに、これらの観察、及び免疫浸潤補充のMRとしてのI K Z F 1 及びD L X 4 の同定は、T細胞特異的分化因子としての役割の外にI K Z F 1 の機能があることを支持し、並びに、A Aにおける自己免疫及び腫瘍免疫回避が正常な免疫相互作用の反対の極端に存在するという仮説の指示を提起する。免疫浸潤のMRの喪失は癌に関連しており、且つ、その過剰発現はA Aにおける自己免疫疾患の発症に関連する。

【0285】

本発明者らは、システム生物学及びネットワーク分析は、2つの異なる組織間の相互作用を媒介する分子メカニズムをモデル化し、主要な調節因子を同定するために、及び他の状況において相互作用形質を再創造するためにそれらを使用するために使用され得ることを示した。これらのMRの検証のための出力は最終的に細胞死の誘導であったが、自己免疫疾患の状況におけるこれらのMRの機能は、最終的に免疫浸潤物にシグナル伝達し、且つ、免疫浸潤物を補充する分子プロファイルを誘導することである。これまで、システム生物学の応用は、主に、癌の細胞自律的分子挙動における「ブレークポイント」を特定することであった。組織間(cross-tissue)相互作用、特に免疫系に関連する相互作用、の制御された誘導は、これまで可能ではなかった調節ネットワークとの複雑な遺伝形質のモデリングの潜在的に有意な道を招く。本発明者らは、異なる組織間の相互作用を含む複雑な疾患においても、研究のための分子挙動を能動的に区画化するために使用することができる概念実証フレームワークを提供する。

【0286】

実験手順

このセクションでは、この研究で実施されているあまり一般的でない、もしくはユニークな方法について説明する。

【0287】

A R A C N e

頭皮用の文脈特異的転写相互作用ネットワークを生成するために、本発明者らは、この研究における分析コホートとは独立した128マイクロアレイ実験のセットでA R A C N e アルゴリズムを使用した。これらの実験は、正常全皮膚生検、A A患者生検、顕微解剖された真皮乳頭突起、並びに分離した真皮及び表皮サンプルの混合物から全皮膚サンプルに対して得られたプラットフォーム適合(A f f y m e t r i x U 1 3 3 2 p l u s) データを表す。これらのサンプルは、頭皮における転写依存性の正確な検出に必要な異質性をまとめて提供する。上記のように実験をプールし、後処理し、そして標準的なA R A C N e 分析を行った。A R A C N e ソフトウェアスイートは、C a l i f a n o 研究室のWebサイト(<http://wiki.c2b2.columbia.edu/califanolab/index.php/Software>)から入手できる。

【0288】

MR解析

特定の遺伝子発現シグニチャについてのMRsは、直接的なA R A C N e 予測T (レギュロン) が遺伝子発現シグニチャにおいて統計的に富化されたTFとして定義された。フ

ィッシャーの正確確率検定 (Fisher's exact test)、FDR=0.05を用いて各TFのレギュロンをAAGSの濃縮について試験した。この分析により、生理学的形質に関連する遺伝子発現モジュールを特異的にカバーするために必要とされるTFの最小数のランク付け及び決定が可能になる。<http://wiki.c2b2.columbia.edu/califanolab/index.php/Software/MARINA>

【0289】

MR活動分類指標

IKZF1及びDLX4のARACNe予測Tは、IKZF1及びDLX4のTとしてマッピングされ得るAAGSのすべての遺伝子を同定するために、外因性遺伝子発現研究と統合された。これは、IKZF1及びDLX4のARACNeレギュロンとAAGSとを交差させることによって行われた。次いで、これらの2つのセットの交差を、少なくとも25%フォールドチェンジ(fold change)で応答するいずれの遺伝子の発現研究においてスクリーニングした。この遺伝子セットを用いて、IKZF1及びDLX4遺伝子座のコンセンサス「メタ活性」を構築した。AA患者コホートにわたる各遺伝子のランク正規化された変化は、親MRの相対活性のコンセンサス尺度として平均値に統合された。

【0290】

これらの値は、その後、AAトレーニングセット内の患者の各々を分類するために、2D検索空間、Math Eq ($X=IKZF1$ メタアクティビティ及び $Y=DLX4$ メタアクティビティ)を定義するために使用された。メタアクティビティベクトル(vectors)は、最小値が検索空間の原点(0,0)に結合され、且つ、活動指標が正であるようにランク変換された。この変換は、検索空間を表示目的のためのより直観的なグリッドに投影する以外、結果には影響しない。[0,n]の間に両方の軸が結合し、ここでnは正の数である。

【0291】

この空間における分類は、修正された非線形のソフトマージンSVMアルゴリズムを用いて行われた。アルゴリズムは公式化される。:

【数1】

$$X=\text{ranksort}(\text{activity}_{X,n})$$

$$Y=\text{ranksort}(\text{activity}_{Y,n})$$

$$\text{define}(A \times B): \forall a \in X, \arg \max_{b \in Y} f(a,b) = \left(\frac{p(S_a, Q_1) \times p(S_a, Q_m)}{p(S_a, Q_1) \times p(S_a, Q_m)} \right)^c$$

【0292】

このアルゴリズムは、検索空間Math Eq内に存在するベクトル集合Math Eqを定義しており、それにより、与えられた各対Math Eqが尤度比(likelihood ratio)Math Eqを最大にするようにする。この関数は、Math EqがMath Eq

Eqに対する疾患重症度の次の順序であるように定義され、且つ、Math Eq及びMath Eqは、超平面Math Eq及びMath Eqによって作成されたグリッドの象限I及びIIIである。トレーニングセット中のサンプルは、既知の分子サブタイプを有する各グリッドにマッピングされ、そして尤度比は、Math Eqによって定義されるサブタイプの分離のために計算される。Math Eqに使用された重症度のランキングは、正常(Normal)<軽度(Mild)<重度(Severe)であった。従って、Math Eqにおける各座標セットは、IKZF1/DLX4メタアクティビティ空間における異なる分子クラスのサンプル間の分離を最大化する非線形平面への点を定義する。

【0293】

細胞毒性アッセイ

P r o m e g a を介して入手可能な C y t o T o x 96 非放射性細胞毒性アッセイを用いて、P B M C 依存性細胞傷害性を測定した。サンプル及び溶液の処理のために、発明者らは製造者のプロトコルに従った。P B M C : T の最適化は以下のように、但し、可変濃度を用いて (1 : 1, 5 : 1 及び 10 : 1) 行った (図 3 2)。

【0294】

細胞毒性実験を 96 ウェル形式で行い、各処理を三重に行った。形質移入は、実験の 36 時間前に行った。実験の日に、H K 及び h u D P 細胞をトリプシン処理し、ダルベッコの改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, D M E M) で希釈して作業ストックにした。1 ウェルあたりの T 濃度は 50 μ L の D M E M 中で 80, 000 細胞であり、800, 000 個の P B M C と組み合わせた。N K G 2 D インヒビターは、20 μ g / m L の最終濃度で用いた R & D S y s t e m s (C a t . M A B 139) からのヒト N K G 2 D M A b (クローン 149810) であった。各形質移入は、製造者の指示に従って三重に割り当てた。

【0295】

遺伝子発現研究

96 人の患者からの合計 122 のサンプルを、28 人の A A P 患者、32 人の A T / A U 患者、及び 36 人の未罹患コントロールからなる A f f y m e t r i x U133 2 P l u s アレイでプロファイリングした。残りの 26 のサンプルは、A A P コホートからの患者適合非病変生検に対応する。これらの非病変サンプルは、初期シグニチャの推論には含まれなかったが、後で使用されました (下記)。これらの患者生検からの R N A を単離し、A f f y m e t r i x U133 2 P l u s アレイで処理した。データの後処理は、B i o c o n d u c t o r を介して入手可能な標準パッケージで M A S 5 正規化を使用して R を介して行われた。これらのデータは、G e n e E x p r e s s i o n O m n i b u s で G S E 68801 として入手可能である。このデータセットは、トレーニングと検証のために 2 つのセットに分かれていた。

【0296】

遺伝子マーカーの最初のパネルは、(1) A A 対罹患していない、及び (2) トレーニングセットにおける病変対非病変、を比較する 2 つの異なる発現解析によって同定された。閾値は、 $p < 0.05$ 及び フォールドチェンジ $> 25\%$ での発現差異 (differential expression) のために設定した。この比較的緩慢な閾値は、ネットワーク分析がコンセンサスに基づくため実施された。分析は、主として候補ランクに関係するものではなく、それよりも T F 活性を推論するのに十分な分子情報を有することに依存する。このアプローチは、ノイズの加算がデータセット全体に適用され、且つ、A R A C N e とマスターレギュレータ解析 (下記参照) の両方でコンセンサスから正規化されるため、より緩和した閾値によって導入される可能性のあるノイズに対して必然的に強固である。発現差異のある遺伝子のランク付け及びクラスタ化におけるいずれの可能性のあるジェンダーバイアスを除去するために、すべての X 結合遺伝子及び Y 結合遺伝子をさらに除去した。

【0297】

遺伝子セット濃縮分析 (Gene Set Enrichment Analysis, G S E A)

G S E A は、定義された遺伝子パネルの発現差異におけるノンパラメトリックな統計的濃縮を測定する方法である。実験コホートとコントロールコホートとの間のデフォルトの発現差異解析が行われ、そして、遺伝子は閾値なしの発現差異によってランクソートされる (すべての遺伝子が含まれる)。これは、ユーザーが指定したいずれの基準 (フォールドチェンジ、p 値など) に従って行うことができる。

【0298】

次いで、この濃縮スコアは、サンプルラベルをシャッフルすることによって、すなわちケースサンプル及びコントロールサンプルをランダム化し、且つ、分析を繰り返すことによって、経験的に生成された帰無分布 (null distribution) と比較される。これを 1000 回の反復にわたって繰り返して、濃縮スコアの帰無分布を生成し、観察されたスコアを

p 値を生成するために比較することができる。

【0299】

クローニング

下記に提供される各プライマー対を、HEK293T細胞に由来するcDNAについての製造業者のプロトコルに従って、Accuprime Taq PCRミックスとのPCR反応において使用した。InvitrogenからのSuperScript First-Strand Synthesis Systemを用いて培養細胞からcDNAを生成した。PCR産物をゲル電気泳動で使い果たし、そして、存在するいずれのアイソフォームをQiagen Gel Extraction Kitを用いて別々に切除した。

10

【0300】

Genewizからの配列決定を介してmRNAの忠実性を確認し、且つ、Smart Cut緩衝液中のNew England Biosystemsからの適切な酵素（SPEI及びASCI）で2時間消化した。pLOC-RFPベクターを並行して消化し、そして切断されたバックボーンをゲル抽出によって切除した。バックボーン及びインサートの精製後、製造業者のプロトコルに従ってRocheからのRapidLigation Kitを用いて各インサートを切断pLOCベクターに連結し、そして、増幅のためにDH5α細胞に形質転換した。

【0301】

成功した形質転換は、コロニーPCR及び配列決定（Genewiz）を介して配列忠実度について検証された。正確な構築物を増幅し、及びMaxiprep（Qiagen）によって実験用に精製した。

20

【0302】

pLOCベクターへの挿入のために遺伝子をクローニングするために使用されるプライマーは、以下のフォーマット、5'から3'： スペーサー酵素-mRNA配列で以下に提供される。

【0303】

IKZF1. 1

フォワード(Forward) GGC-AC TAGT-ATGGATGCTGATGAGGGTCA A

30

リバーズ(Reverse) ATT-GGC GCGCC-TTAGCTCATGTGGAAGCGGT

IKZF1. 2

フォワード GGC-AC TAGT-ATGGATGCTGATGAGGGTCAAG

リバーズ ATT-GGC GCGCC-TTAGCTCATGTGGAAGCGGT (1. 1と同一)

DLX4

フォワード GGC-AC TAGT-ATGAAACTGTCCGTCCCTACCC C

リバーズ ATT-GGC GCGCC-TCATTTCACACGCTGGGGCTGG

【0304】

40

細胞培養及び形質移入

hUDP及びHK細胞の両方を、増殖のための標準条件： 37℃及び5%CO2においてDMEM 10%FBSにおいて、維持した。hUDP細胞は、ヒトの皮膚サンプルから顕微解剖された培養初代ヒト真皮乳頭である。この研究の実験では、継代数が6未満(<6)のhUDP及びHK細胞のみを使用した。

【0305】

製造元のプロトコルに従ってJetPRIME形質移入試薬を用いて細胞をpLOC発現構築物で形質転換した。形質移入は、試薬(u l)とDNA(u g)との2:1濃度を用いて一晩行われた。

【0306】

50

MRレスキューのマイクロアレイ

I K Z F 1 及び D L X 4 の H K 及び h u D P 細胞への形質移入を、上記のように、10 cm プレートで培養した細胞中で行った。形質移入の36時間後(36 hours post-transfection)、細胞を掻き取りしたPBS中でこれらの細胞を回収し、次いで、製造元のプロトコルに従ってQiagenのRNeasyキットを用いて精製したRNAを溶解し、処理した。RNA品質管理は、分光計を使用して行い、且つ、コロンビア施設(病理学科)によってAffymetrixヒトU133 2 Plusアレイ上で処理するために提出された。アレイデータを再び正規化し、そして、RにおけるBioconductorパッケージを介したMASS5正規化を用いて処理した。

【0307】

10

qPCR

8つの一次病変(primary lesional)生検(1つは劣化していることがわかり、研究から除外された)、4つの未罹患コントロール、及び患者適合性病変サンプルと非病変サンプルとのペア5対の独立したコホートから抽出されたcDNAについて、定量PCR反応を行った。SYBR Greenを用いた反応ミックスを、製造業者のプロトコルに従って25 µL容量で作製し、Applied Biosystemsからの7300シリーズリアルタイムPCR装置で分析した。各遺伝子のプライマーは、このセクションの最後に提供される。

【0308】

全てのサンプルをスタンププレート形式の技術的三連体で試験した(それぞれの複製は、すべての試料及びコントロールを一度に調製し、3回反復して1つのプレートで行った)。これらの複製からのデータを、 $\delta\delta CT$ 法により分析し、すべての実験系列をコントロール組織の平均正規化値に正規化した。平均値の標準誤差(SEM)は、標準的な統計的誤差伝搬を用いて比較にわたって得られた。

20

【0309】

qPCRによる転写産物をアッセイするためのプライマーは、5'から3'で以下に提供される。転写物が約300 bpである(提供されたプロトコルの最適転写物長が200~300 bpである)ため、DLX4の全長増幅のためのプライマーを使用した。

【0310】

I K Z F 1

30

フォワード A C T C C G T T G G T A A A C C T C A C

リバース C T G A T C C T A T C T T G C A C A G G T C

D L X 4

クローニングプライマーと同じ

A C T B

フォワード G A A G G A T T C C T A T G T G G G C G A C

リバース G G G T C A T C T T C T C G C G G T T G

【0311】

新鮮な末梢血単核球(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)の分離

意図された細胞毒性アッセイの前の夕方に引き出される(draws)全血から新鮮なPBMCを単離した。PBMCを、滅菌PBS中の全血 1:1の8 mLアリコートで希釈し、及び最終体積比2:1でFicoll上に前記溶液を重層することにより、Histopaque-1077試薬(Ficoll)を用いて全血から分離した。この溶液を1200 rpmで45分間遠心分離した。単球含有界面層を単離し、5倍容量の滅菌PBSで希釈し、及び1500 rpmで15分間再度遠心分離した。上清を捨て、ペレットを3 mLのDMEM 10% FBSに再懸濁した。血球計数器を用いて細胞計数を行い、そして、溶液をDMEM 10% FBSで1 mLあたり 1×10^6 細胞の最終濃度に希釈した。これを翌朝実験のために37°C及び5% CO₂で一晩保存した。

40

【0312】

図示され特許請求される様々な実施形態に加えて、開示される主題はまた、本明細書に

50

開示され、特許請求される特徴の他の組み合わせを有する他の実施形態に関する。このように、本明細書に提示される特定の特征は、開示される主題が本明細書に開示される特徴の任意の適切な組合せを含むように、開示される主題の範囲内の他の方法で互いに組み合わせることができる。開示された主題の特定の実施形態の前述の説明は、例示及び説明のために提示されている。包括的であること、又は開示された主題を開示された実施形態に限定することを意図するものではない。

【0313】

様々な刊行物、特許及び特許出願、及びプロトコルが本明細書に引用されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【図1A】

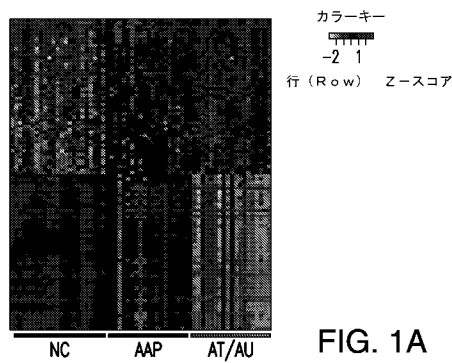
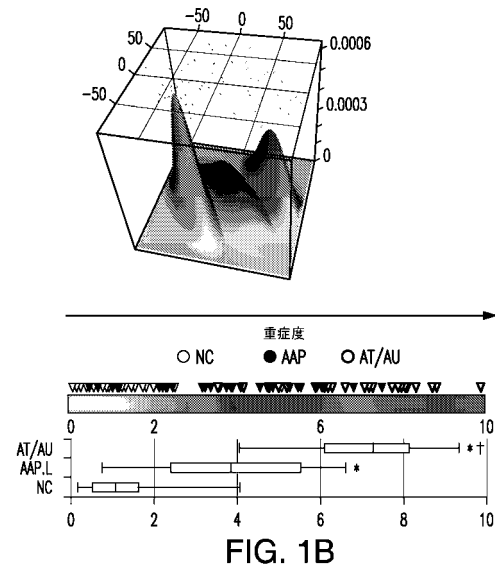


FIG. 1A

【図1B】



【 図 2 A 】

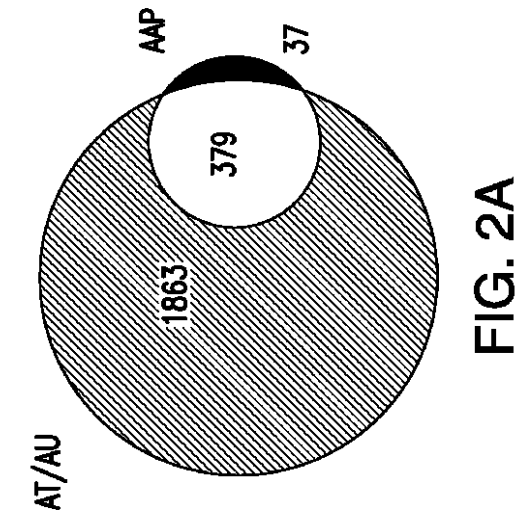


FIG. 2A

【 図 2 B 】

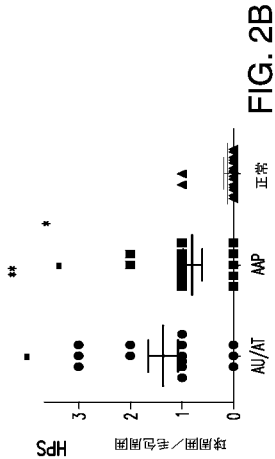


FIG. 2B

【 図 2 C 】

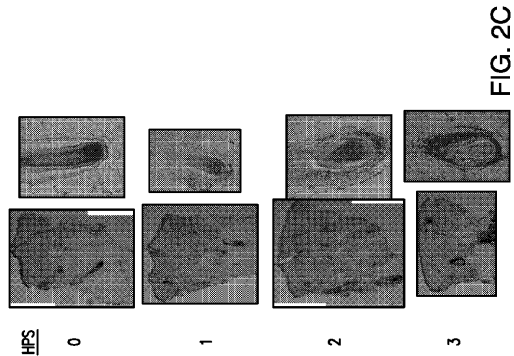


FIG. 2C

【 図 2 D 】

KEGG経路	AT/AU	AAP
造血細胞系	1.32E-10	2.92E-09
細胞接着分子 (CAMs)	7.29E-10	1.53E-10
同種移植片拒絶	1.55E-09	4.26E-12
ケモカインシグナル伝達経路	2.66E-09	1.04E-07
I型真性糖尿病	6.55E-09	2.76E-12
移植片対宿主病	9.78E-09	7.52E-13
喘息	2.70E-08	8.83E-07
サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用	1.93E-07	3.67E-10
I g A産生に対する腸管免疫ネットワーク	2.75E-07	1.07E-06
原発性免疫不全症	2.10E-06	5.20E-08
抗原プロセッシング及び提示	2.76E-06	8.19E-09
ウイルス性心筋炎	6.47E-06	6.36E-08
自己免疫性甲状腺疾患	7.19E-06	9.25E-09
全身性エリテマトーデス	7.72E-05	9.09E-07
T細胞受容体シグナル伝達経路	0.0038	1.90E-05
NK細胞媒介性細胞傷害	0.0086	0.00013

FIG. 2D

【図 2 E】

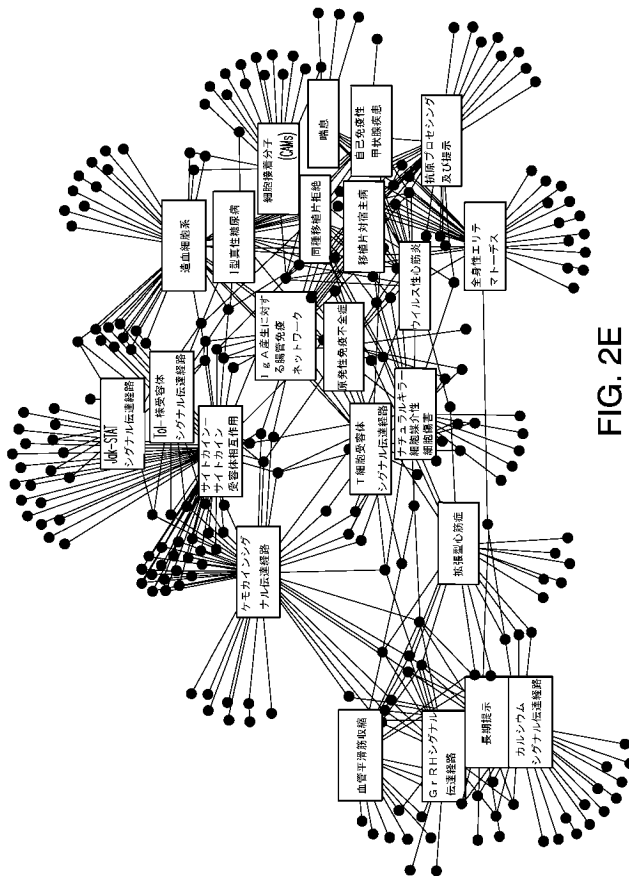


FIG. 2E

【図 3 A - 1】

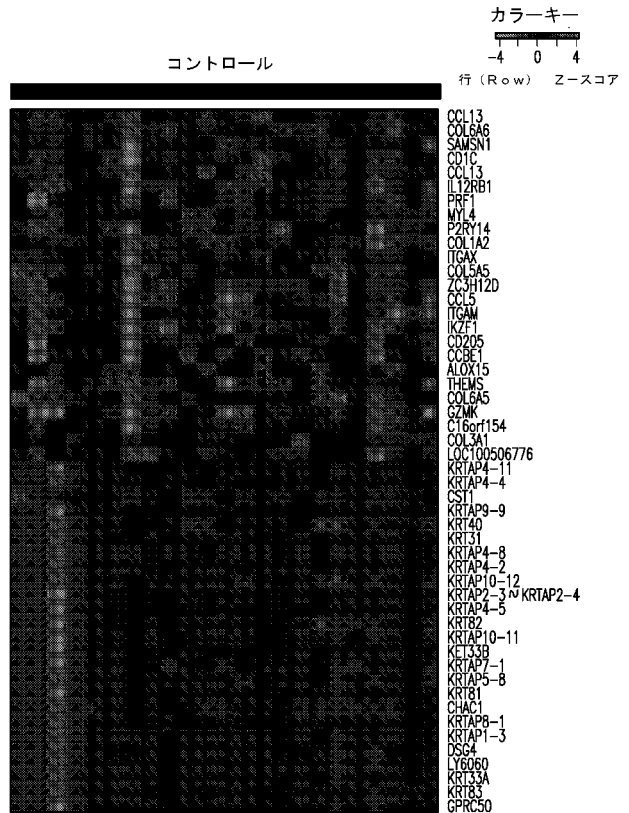


FIG. 3A

【図 3 A - 2】

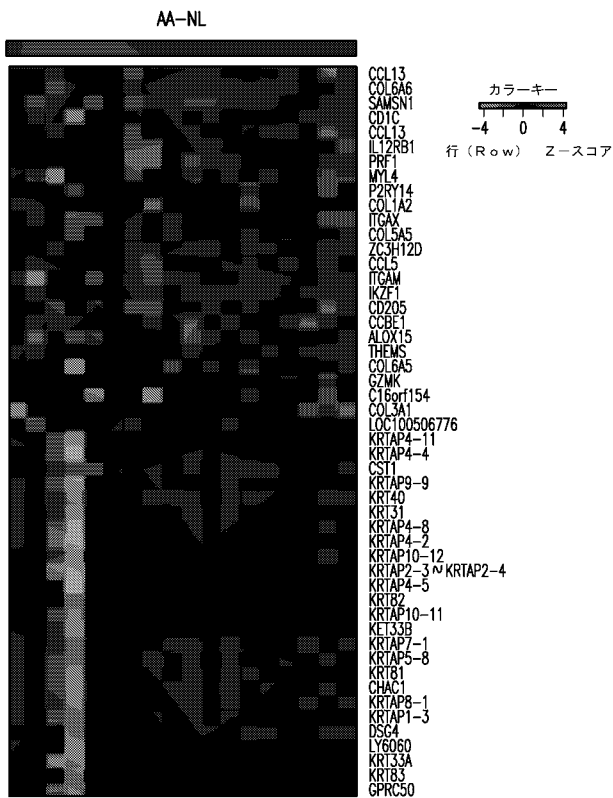


FIG. 3A continued

【図 3 A - 3】

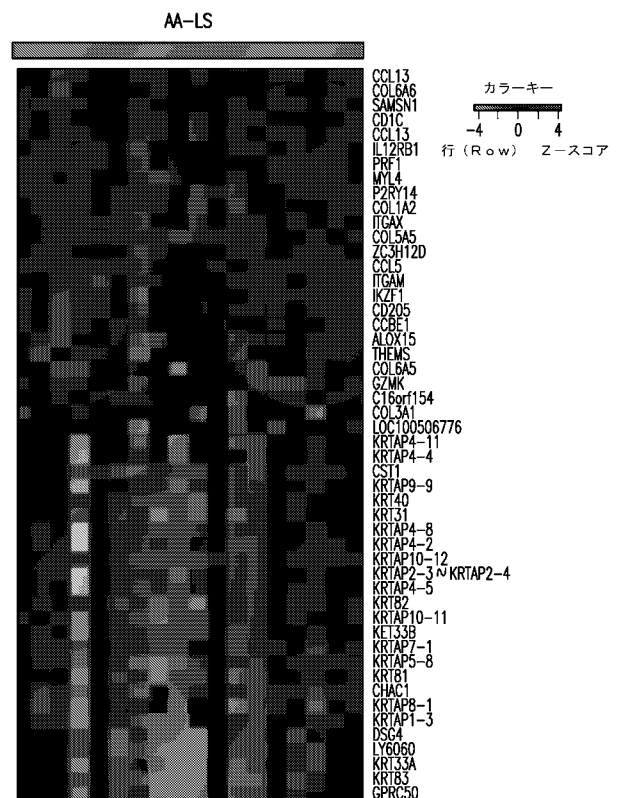


FIG. 3A continued

【図 5 A】

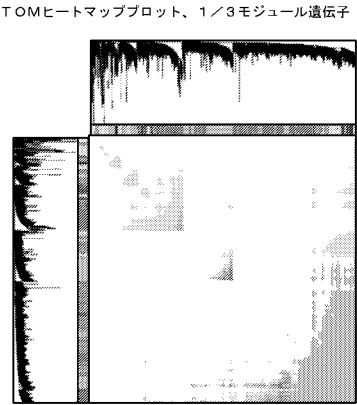
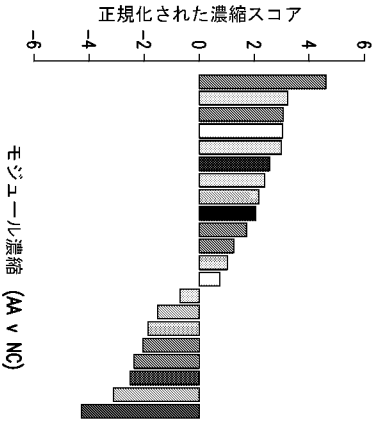
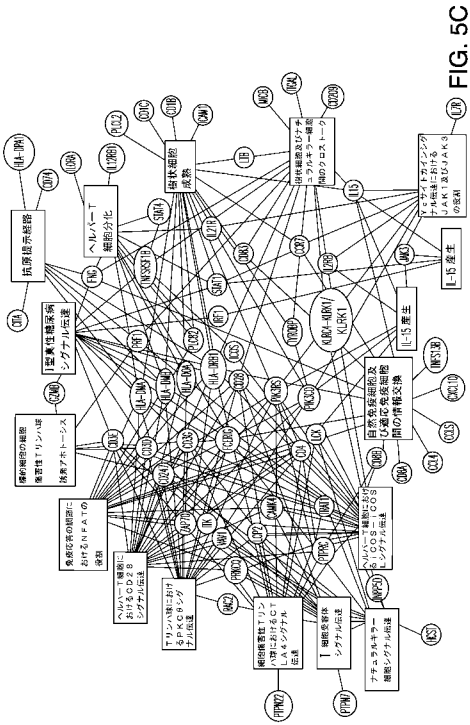


FIG. 5A

【図 5 B】



【図 5 C】



【図 5 D】

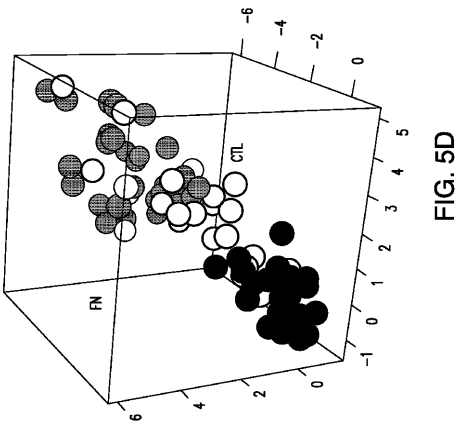


FIG. 5D

【図 5 E】

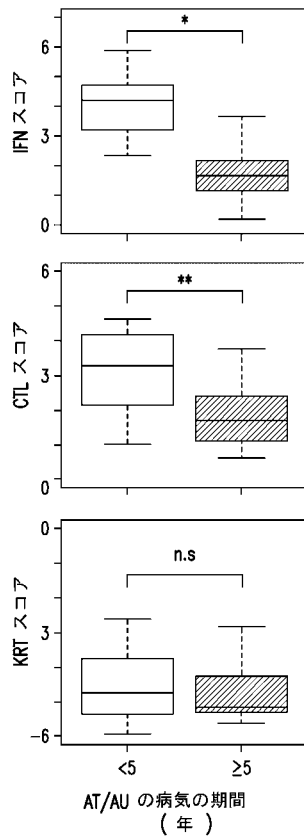


FIG. 5E

【図 7 A】

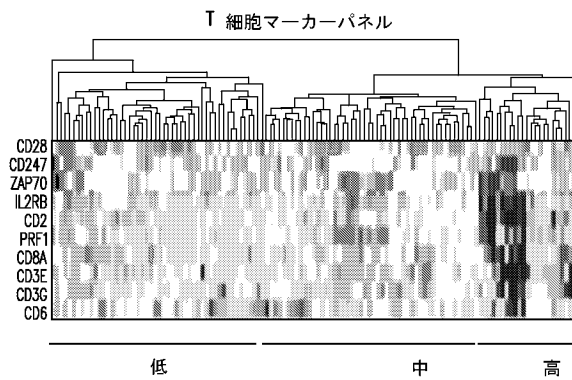


FIG. 7A

【図 7 B】

%	低	中	高
N	72	26	2
AAP	41	47	12
AT/AU	22	33	45

$$\chi^2=33.36$$

$$p=1 \times 10^{-6}$$

FIG. 7B

【図 6】

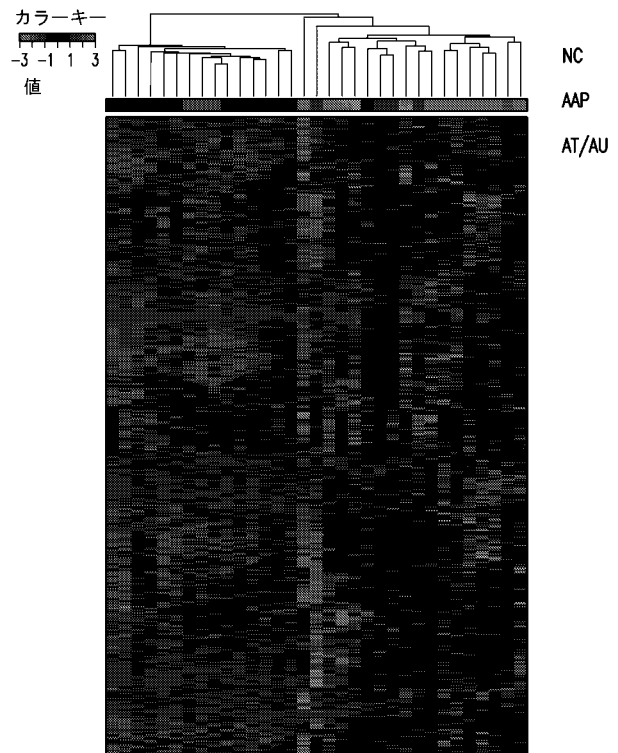


FIG. 6

【図 8 A】

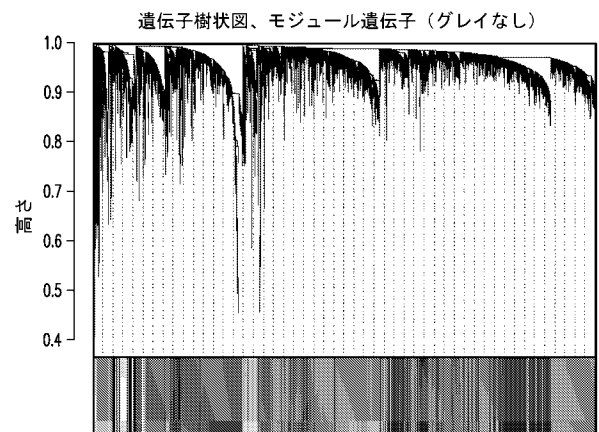
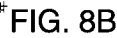
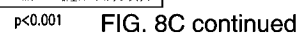
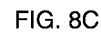
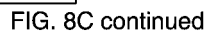


FIG. 8A

【図 8 C - 1】



【図 8 C - 3】



【図 9】

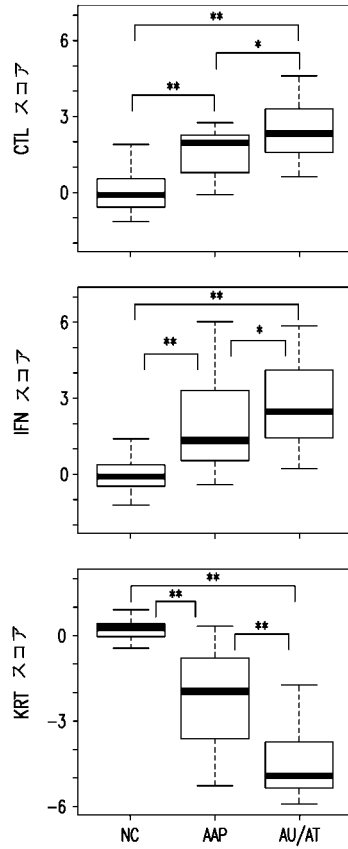


FIG. 9

【図 10】

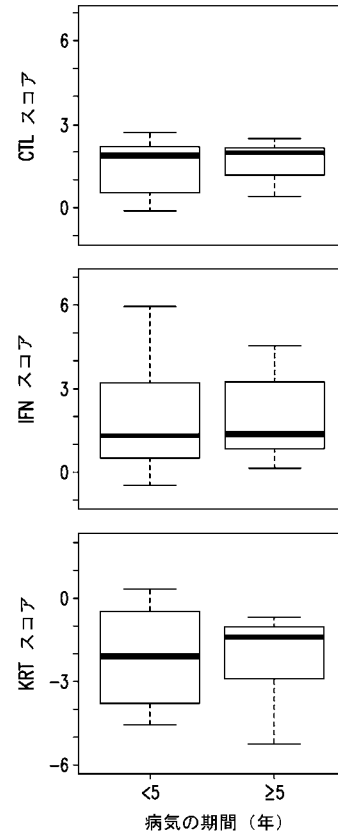


FIG. 10

【図 11A】

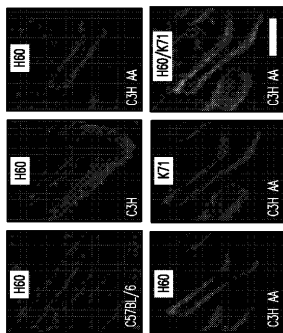


FIG. 11A

【図 11B】

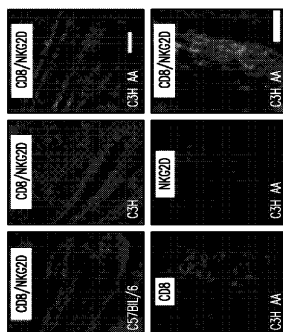


FIG. 11B

【図 11C】

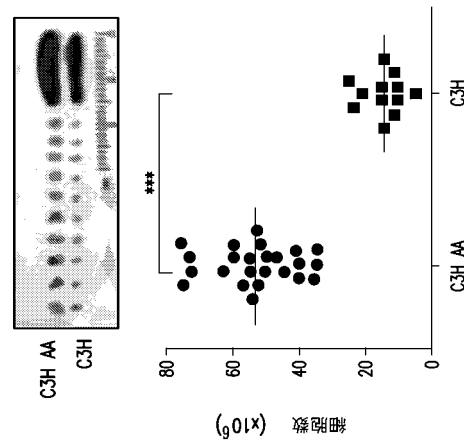


FIG. 11C

【図 1 1 D】

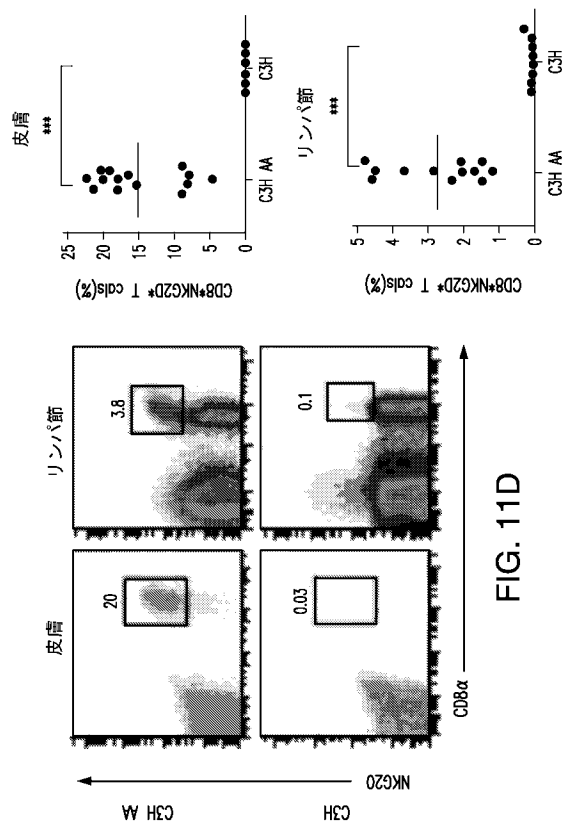


FIG. 11D

【図 1 1 E】

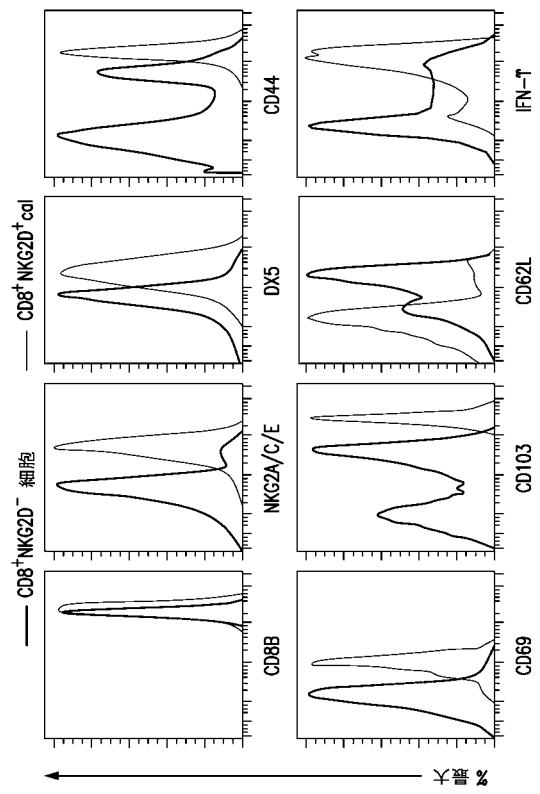


FIG. 11E

【図 1 1 F】

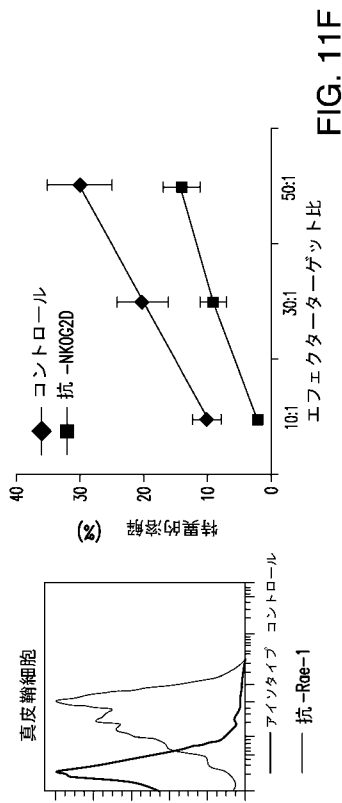


FIG. 11F

【図 1 1 G】

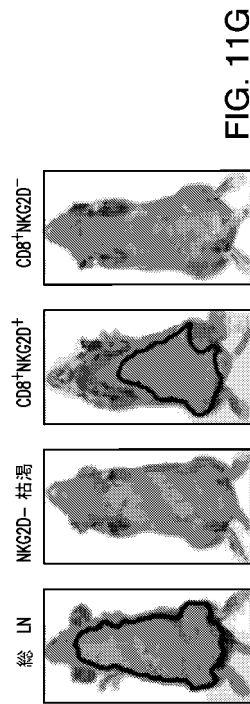


FIG. 11G

【図 1 2 A】

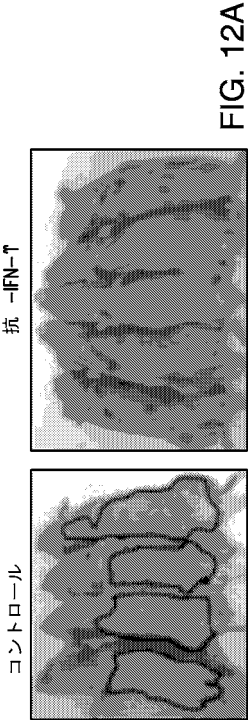


FIG. 12A

【図 1 2 C】

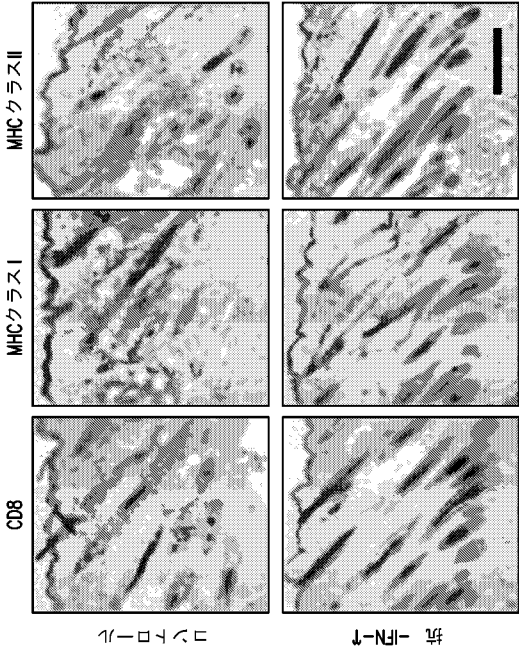


FIG. 12C

【図 1 2 B】

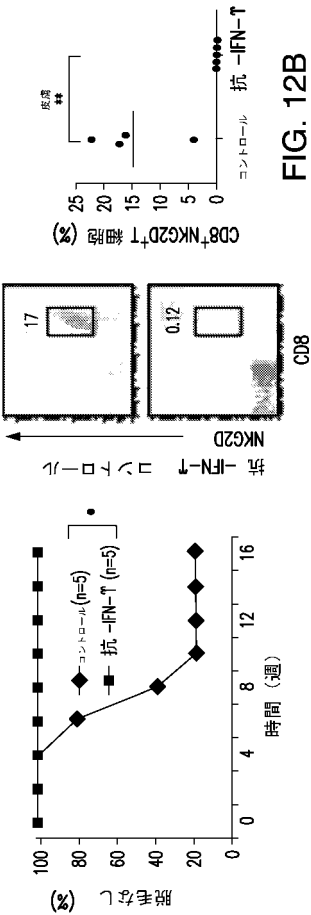


FIG. 12B

【図 1 2 D】

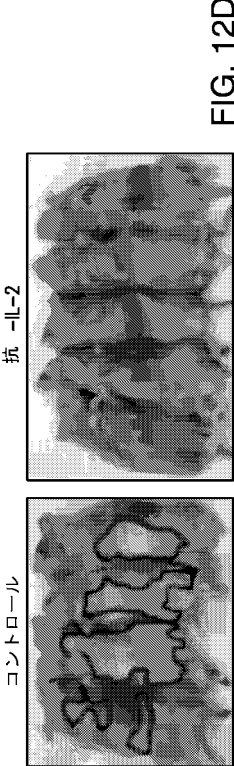


FIG. 12D

【図 1 2 E】

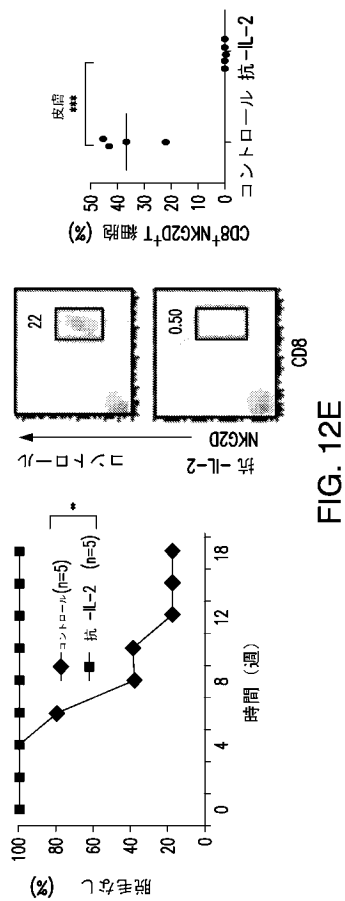


FIG. 12E

【図 1 2 G】

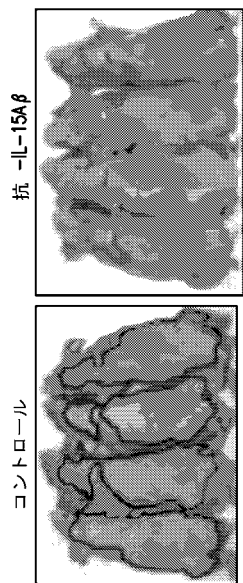


FIG. 12G

【図 1 2 F】

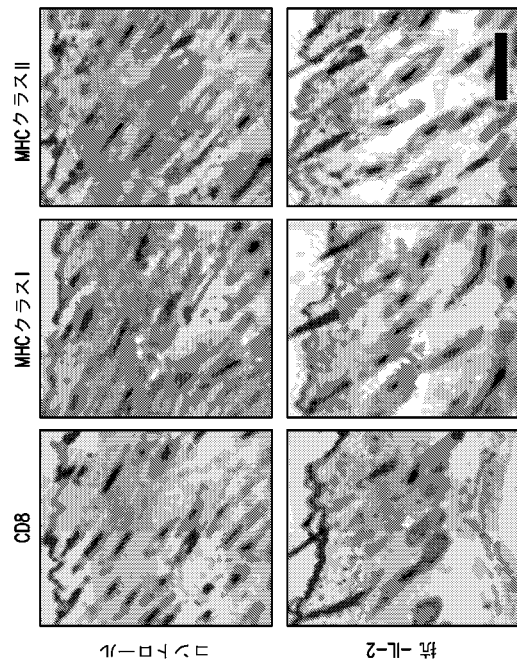


FIG. 12F

【図 1 2 H】

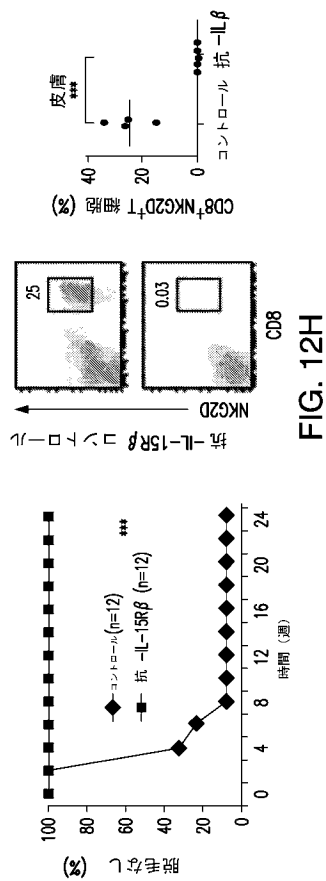


FIG. 12H

【図 1 2 I】

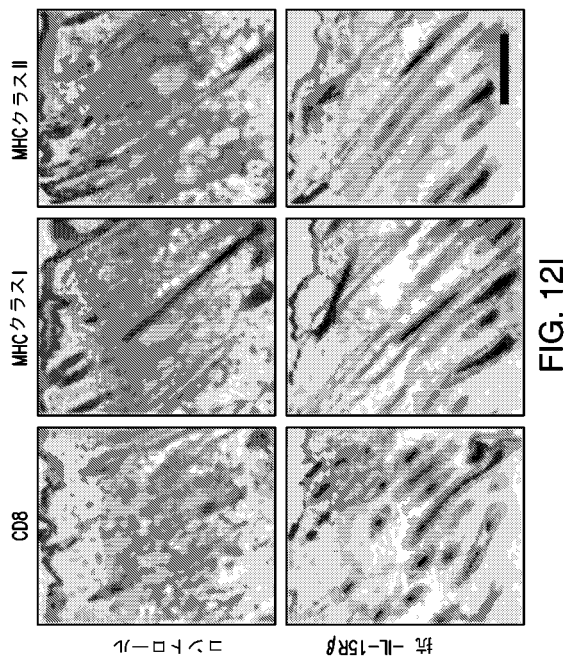


FIG. 12I

【図 1 3 A】

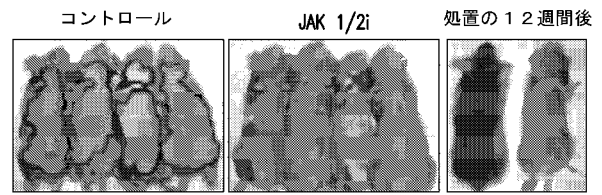


FIG. 13A

【図 1 3 B】

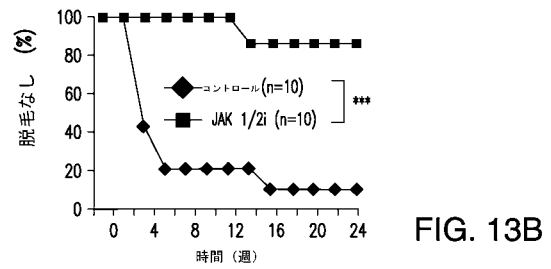


FIG. 13B

【図 1 3 C】

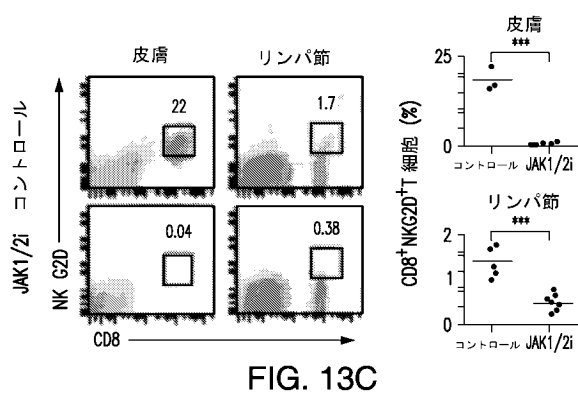


FIG. 13C

【図 1 3 D】

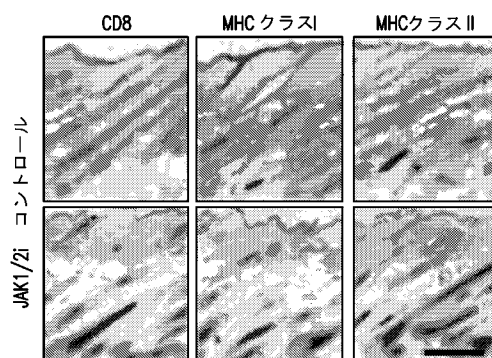


FIG. 13D

【図 1 3 E】

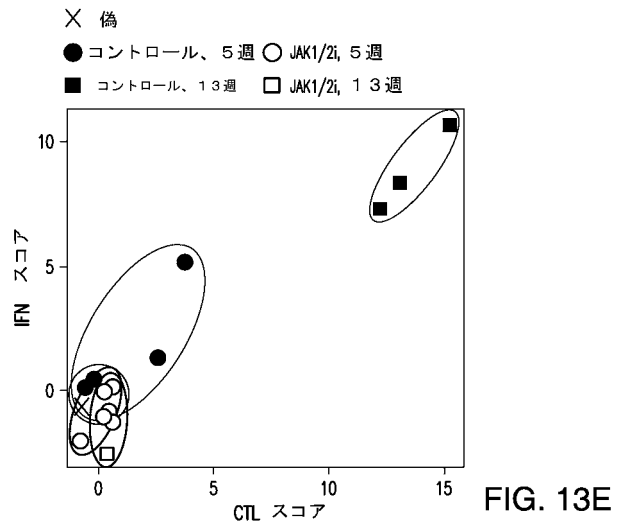


FIG. 13E

【図 1 3 F】

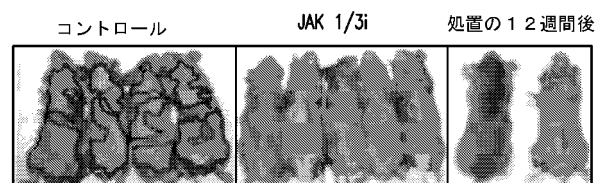


FIG. 13F

【図 1 3 G】

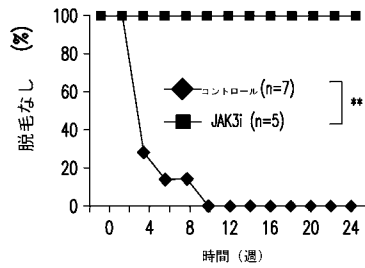


FIG. 13G

【図 1 3 H】

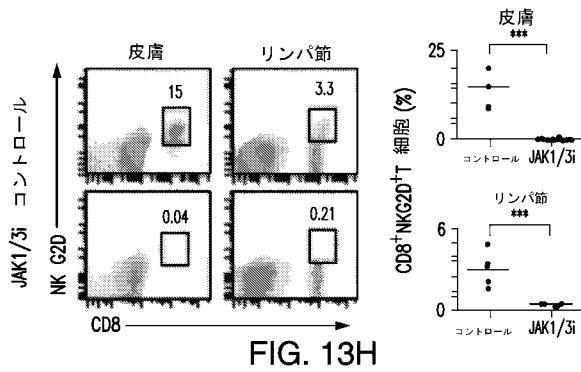


FIG. 13H

【図 1 3 J】

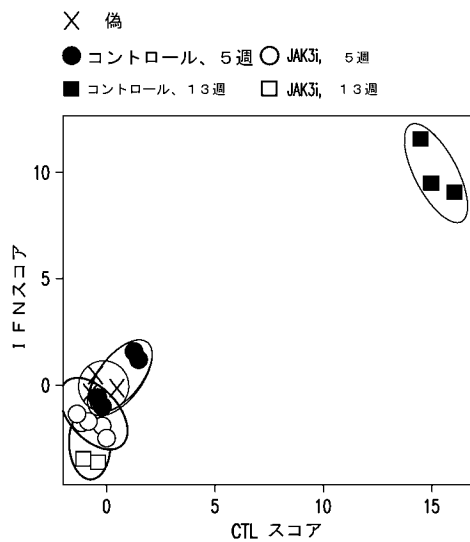
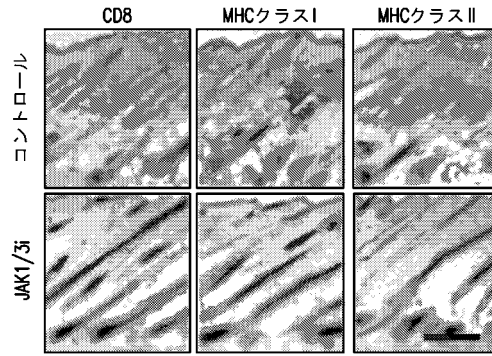


FIG. 13J

【図 1 3 I】



【図 1 4 A】

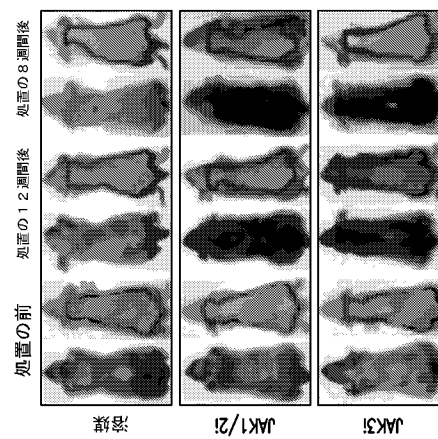


FIG. 14A

【図 1 4 B】

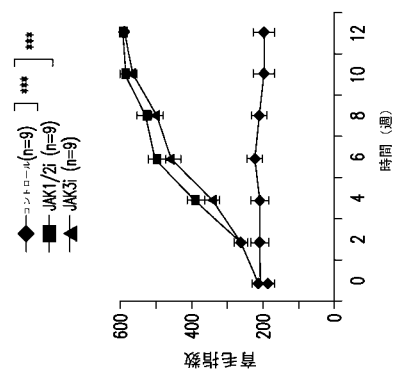
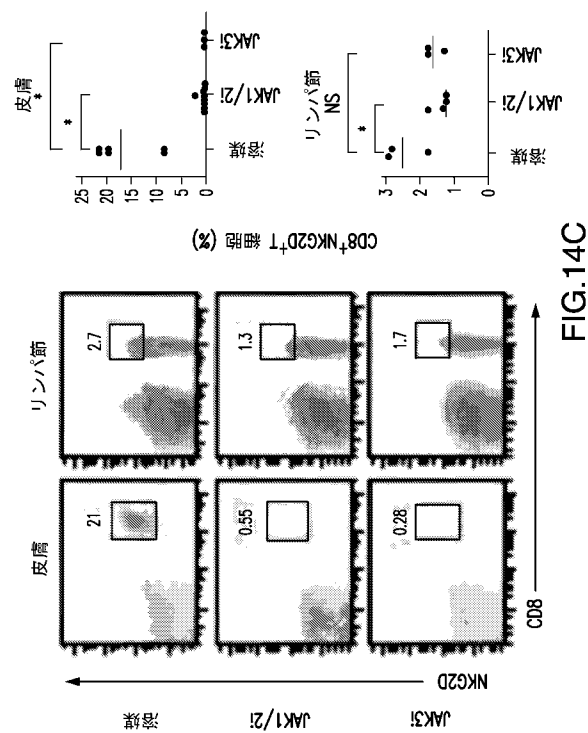
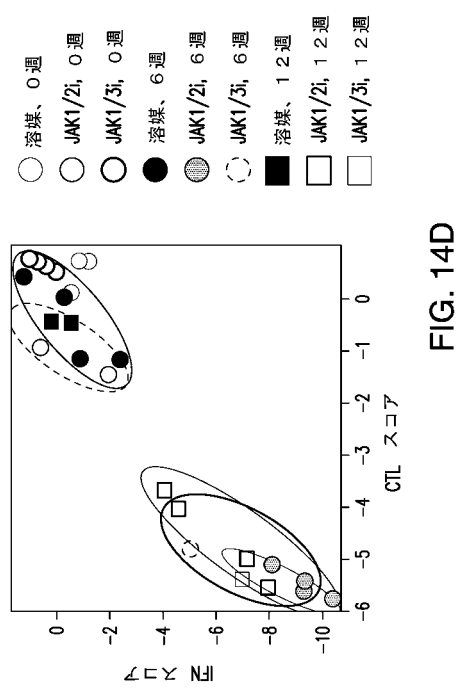


FIG. 14B

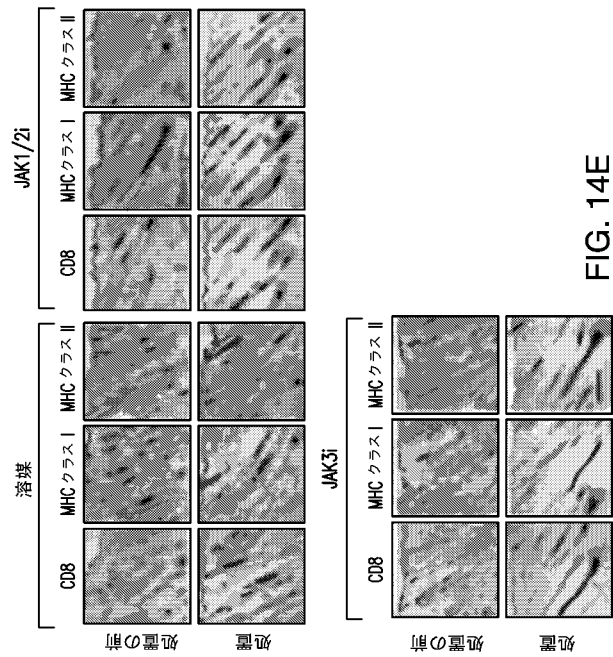
【図 1 4 C】



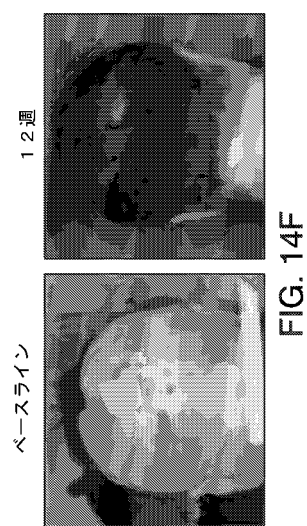
【図 1 4 D】



【図 1 4 E】



【図 1 4 F】



【図 1 4 G】

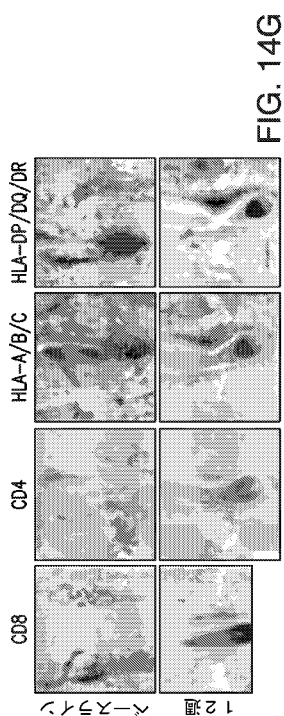


FIG. 14G

【図 1 4 H】

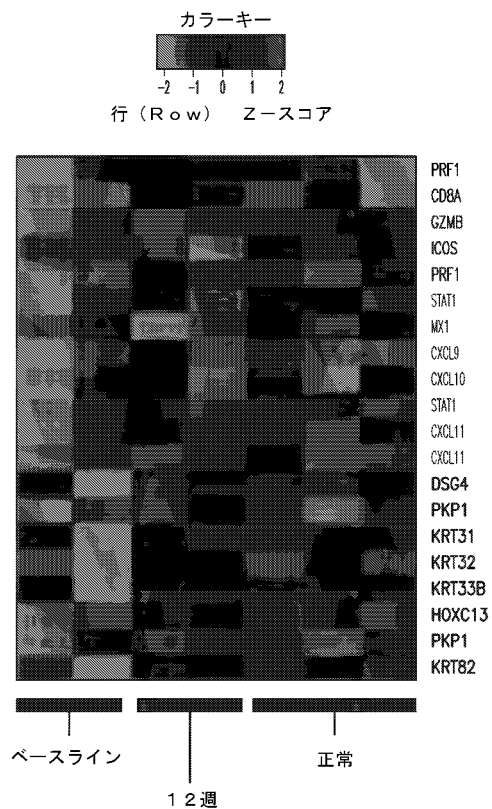


FIG. 14H

【 図 1 4 I 】

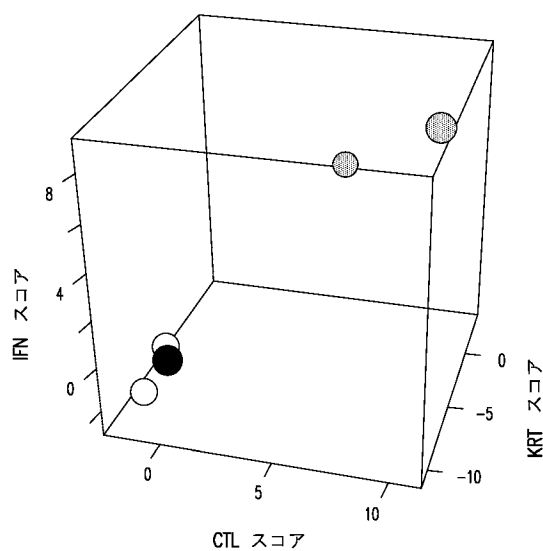


FIG. 14I

【図 15】

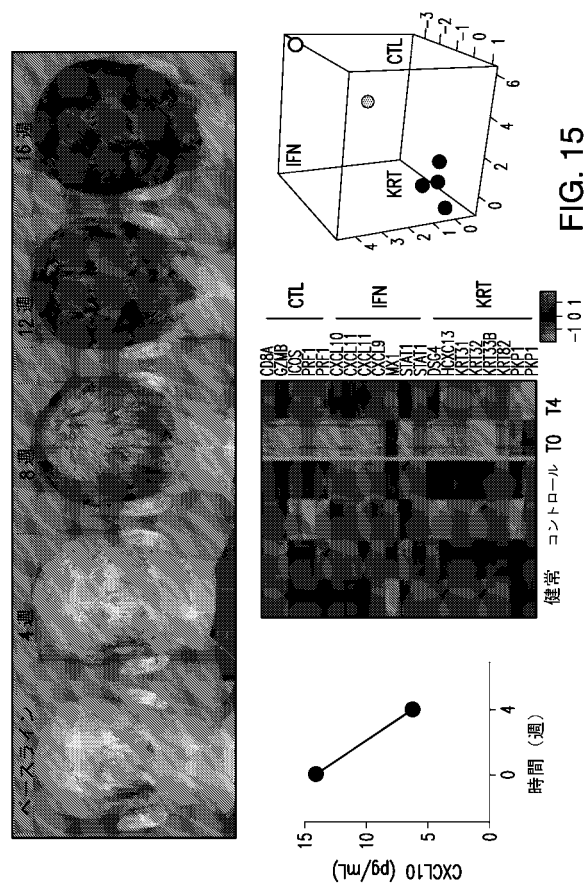


FIG. 15

【図 16】

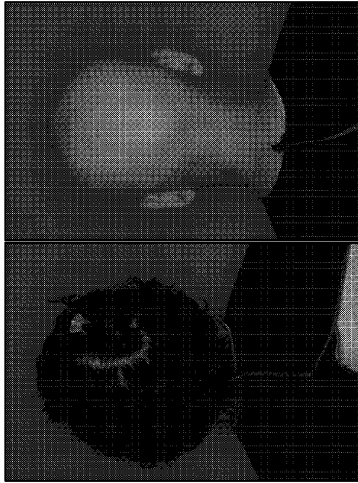


FIG. 16

【図 17】

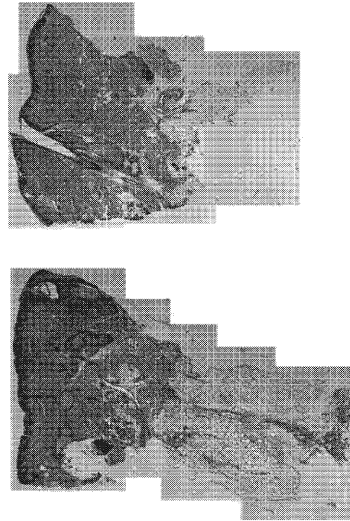


FIG. 17

【図 18 - 1】

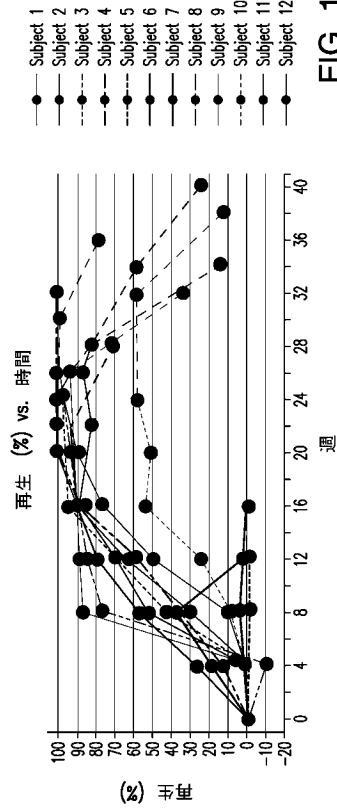
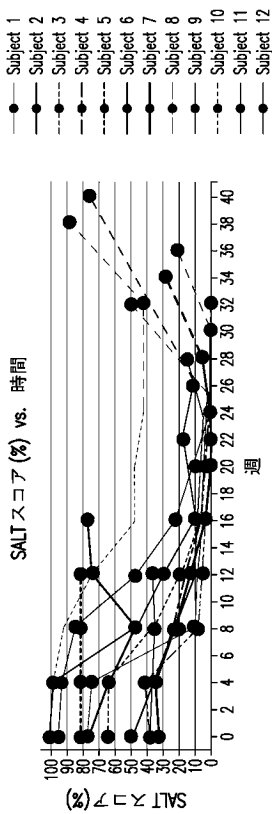


FIG. 18

【図 18 - 2】

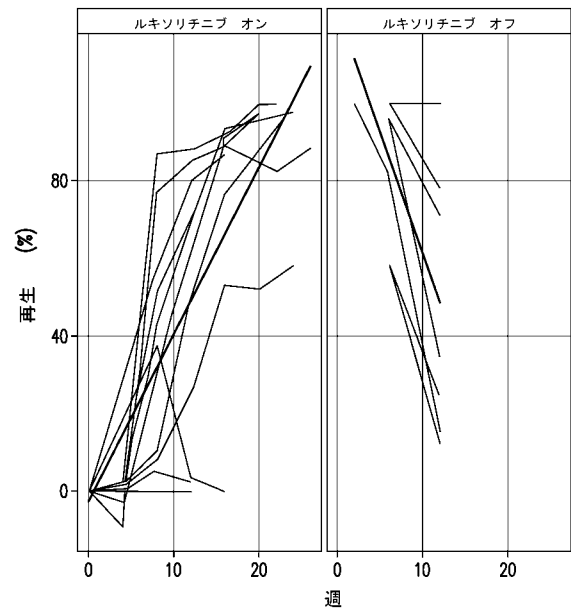
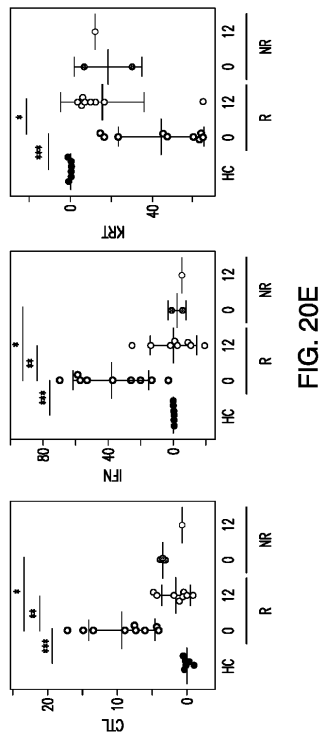


FIG. 18 continued

【図 20 E】



【図 21 A】

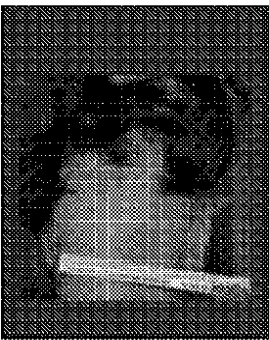


FIG. 21A

【図 21 B】

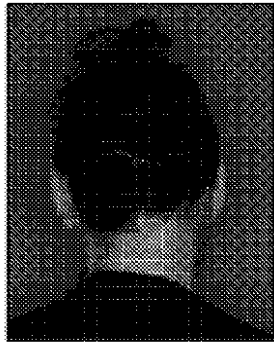


FIG. 21B

【図 21 C】

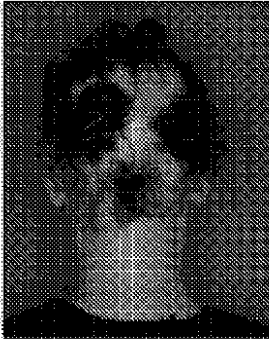


FIG. 21C

【図 2 1 D】



FIG. 21D

【図 2 1 E】



FIG. 21E

【図 2 1 F】

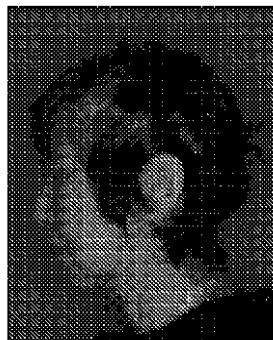


FIG. 21F

【図 2 1 G】

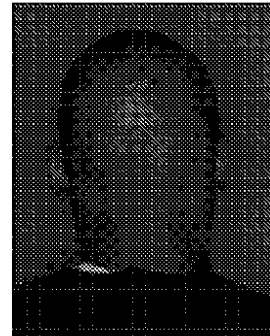


FIG. 21G

【図 2 1 H】

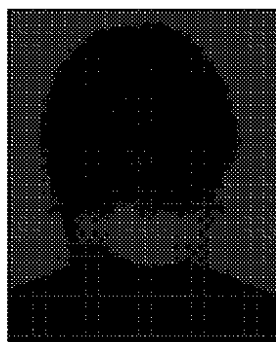


FIG. 21H

【図 2 1 I】

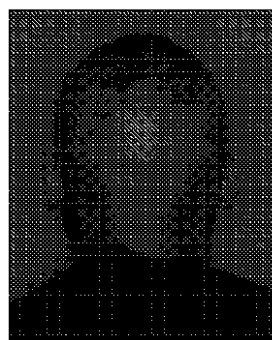


FIG. 21I

【図 2 2】

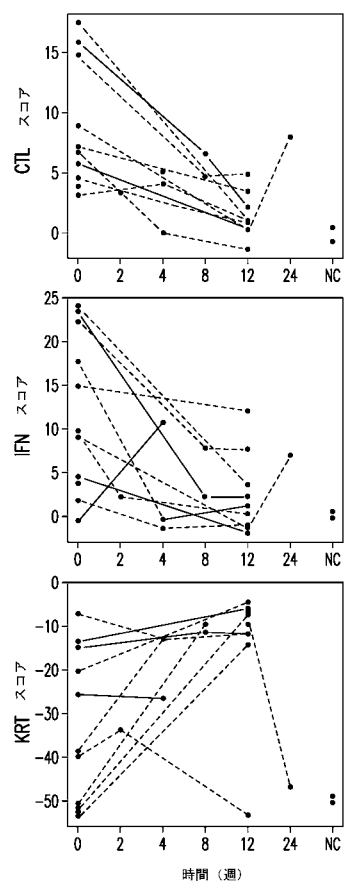


FIG. 22

【図 2 3 A】

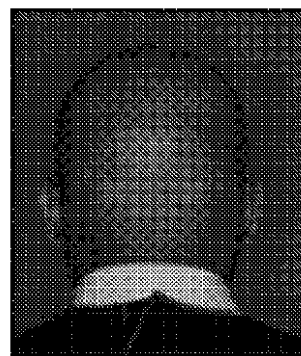


FIG. 23A

【図 2 3 B】

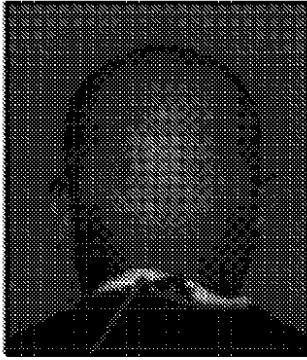


FIG. 23B

【図 2 3 C】

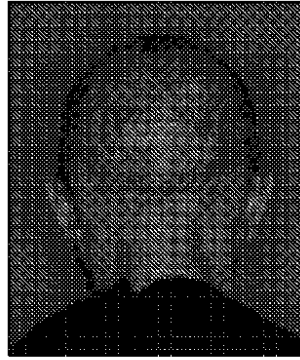


FIG. 23C

【図 2 3 D】

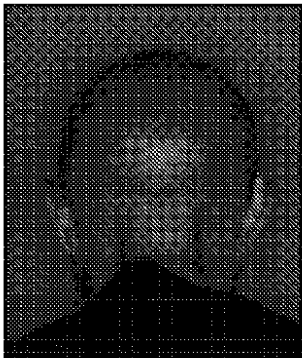


FIG. 23D

【図 2 3 E】

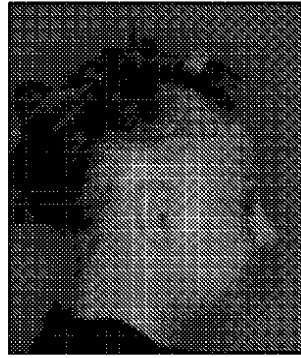
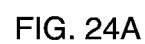
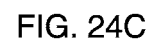
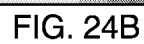


FIG. 23E

【図 2 4 A】



【図 2 4 C】



【 図 2 5 A 】

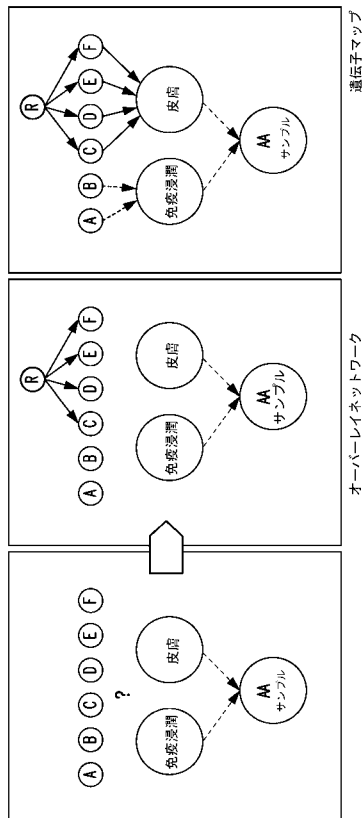


FIG. 25A

【图 2 5 B】

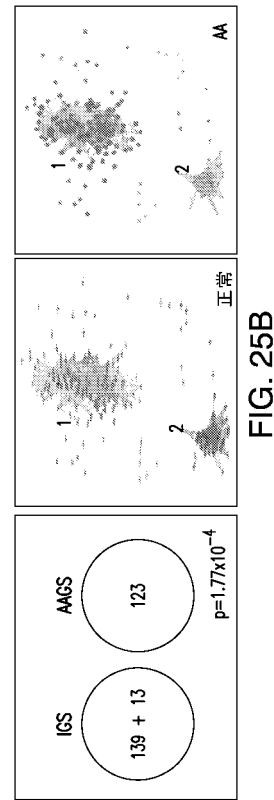


FIG. 25B

【図 2 5 C - 1】

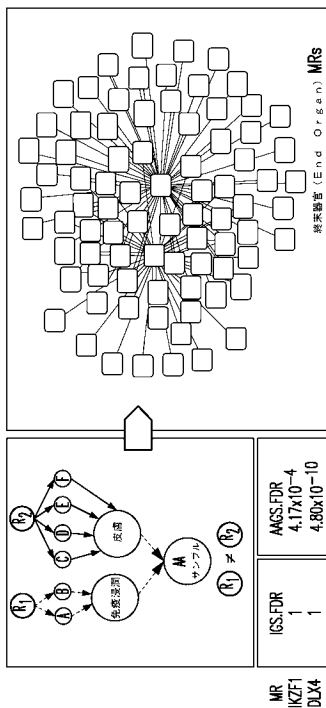


FIG. 25C

【図 2 5 C - 2】

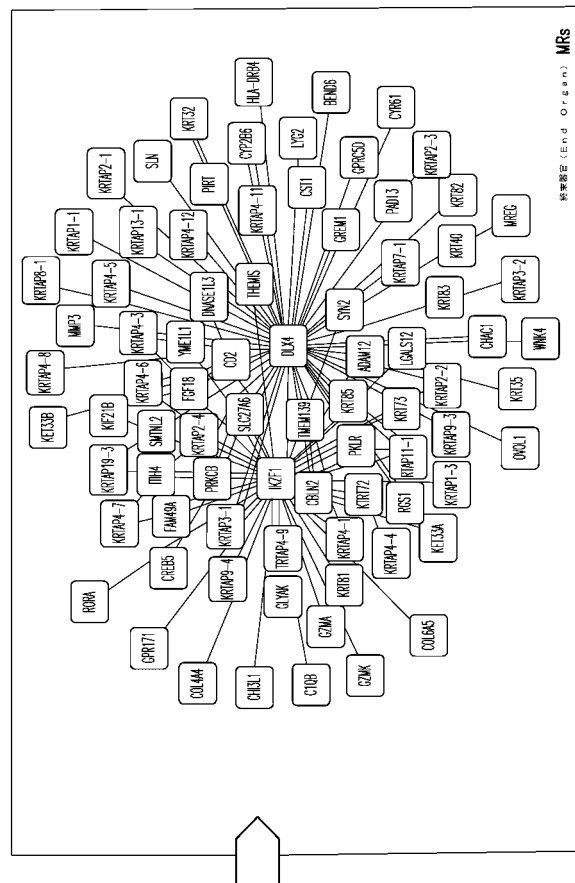
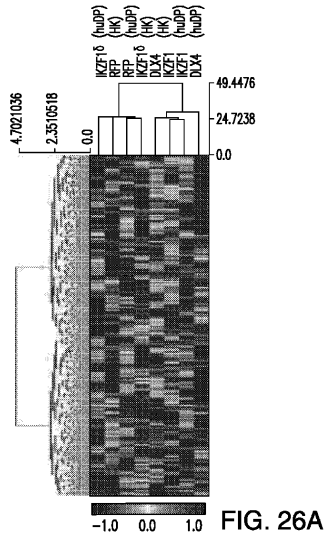
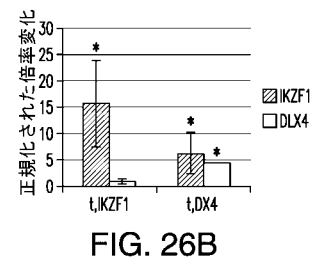


FIG. 25C continued

【図 26 A】



【図 26 B】



【図 26 C】

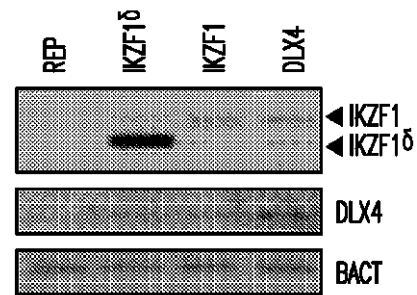


FIG. 26C

【図 26 D】

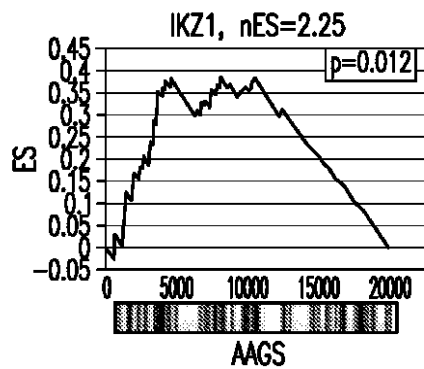


FIG. 26D

【図 26 E】

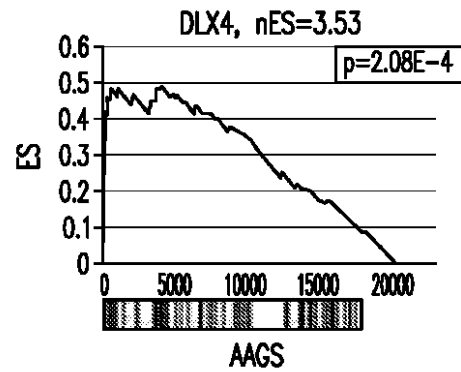
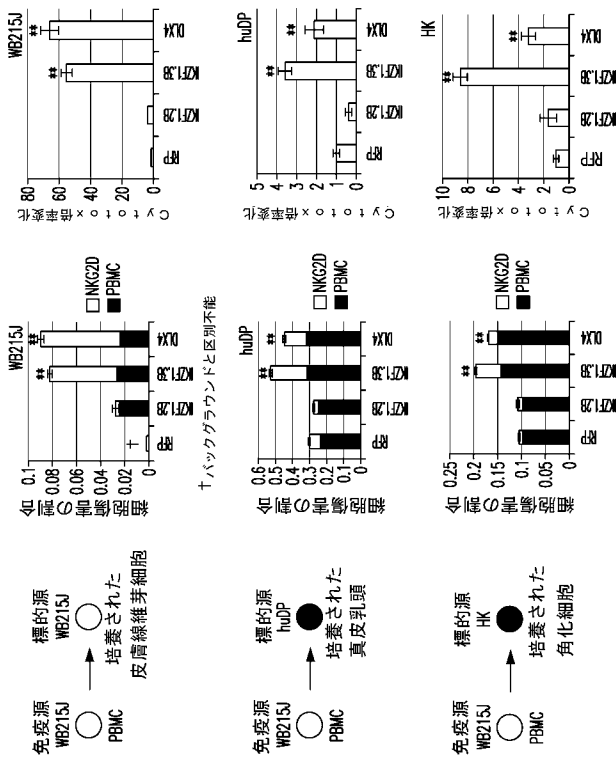


FIG. 26E

【図 27】



【図 28 A】

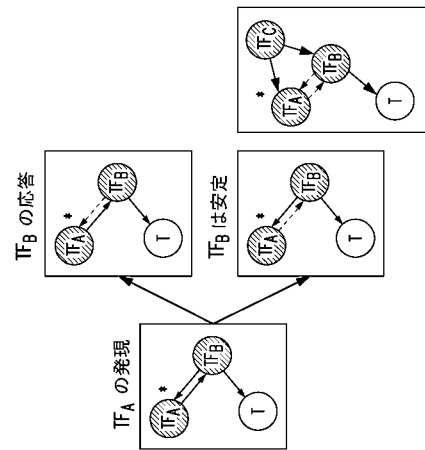


FIG. 28A

【図 28 B】

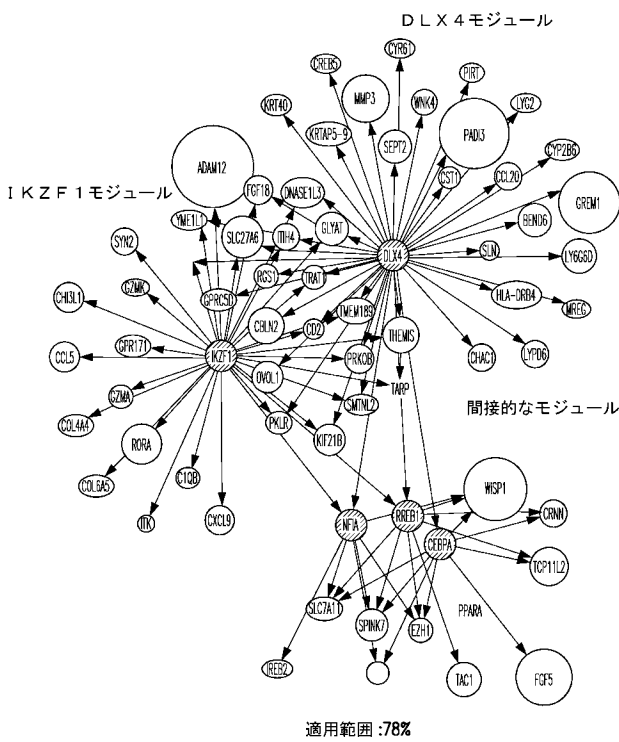


FIG. 28B

【図 28 C】

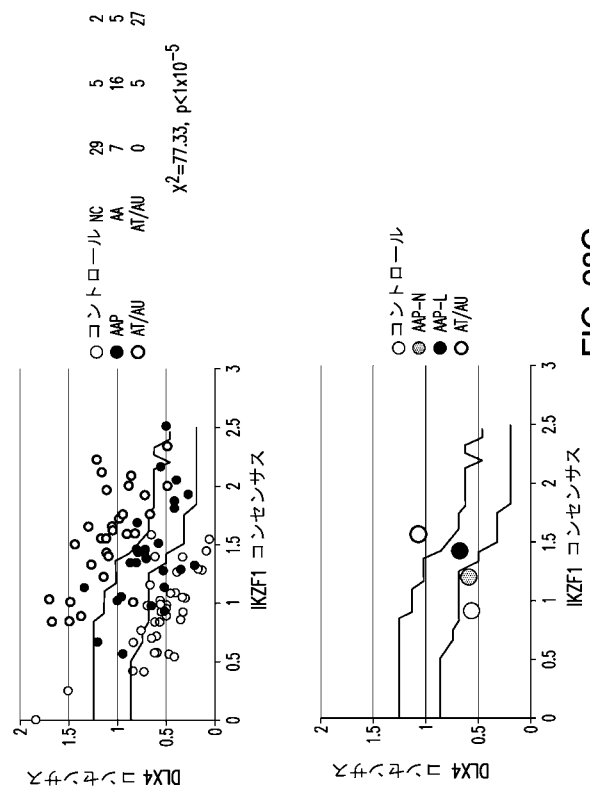


FIG. 28C

【 図 2 9 A 】

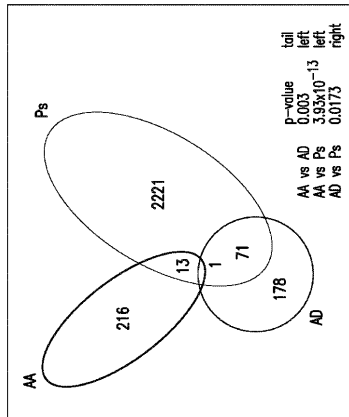
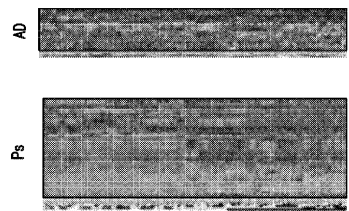


FIG. 29A



【图 2 9 B】

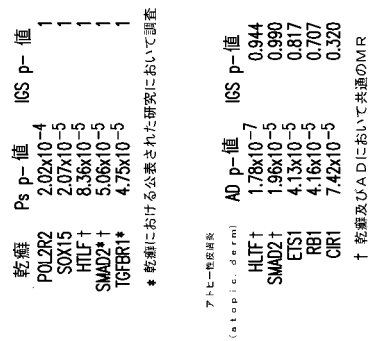
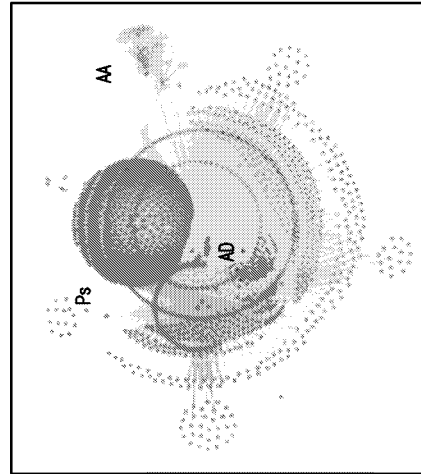


FIG. 29B



【図 30-1】

免疫相互作用ネットワーク

ネットワーク 14 : 発現差異がある遺伝子 -2014-07-24 10:43 AM: 発現差異がある
遺伝子: 発現差異がある遺伝子 -2014-07-24 10:43 AM

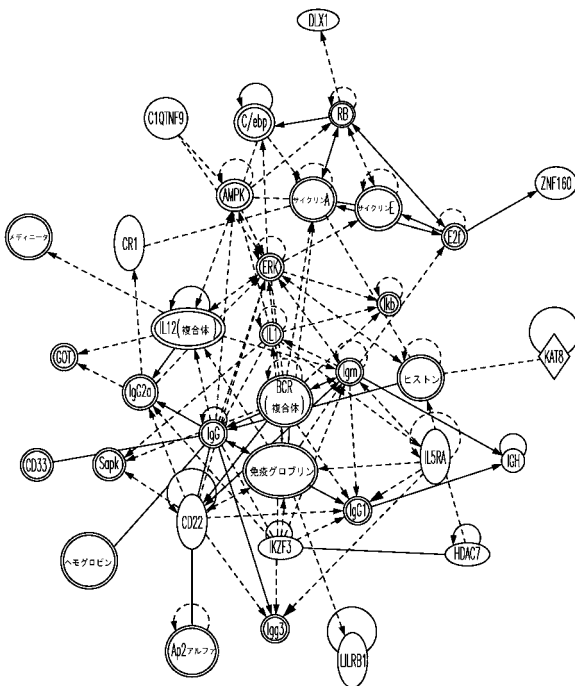


FIG. 30

【図 3 0 - 2】

細胞傷害相互作用ネットワーク

ネットワーク9：発現差異がある遺伝子-2014-07-24 10:43 AM:
発現差異がある遺伝子・発現差異がある遺伝子-2014-

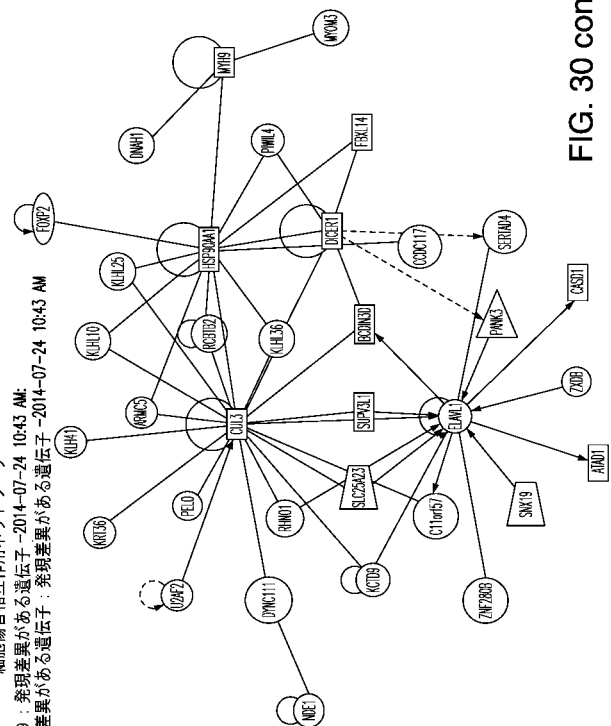
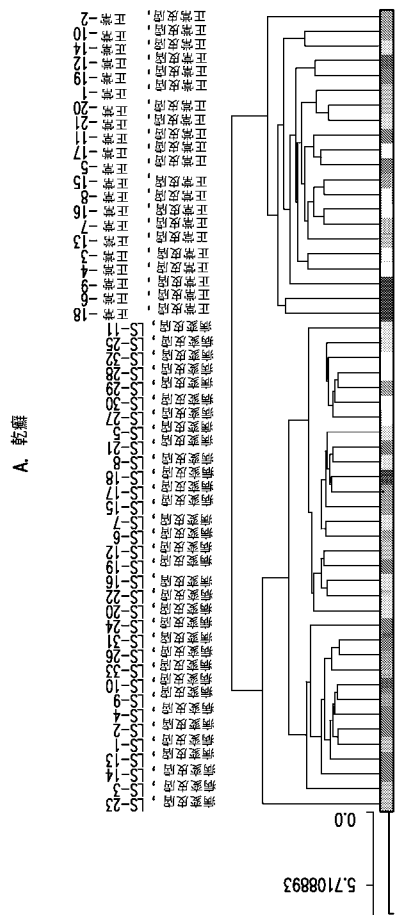
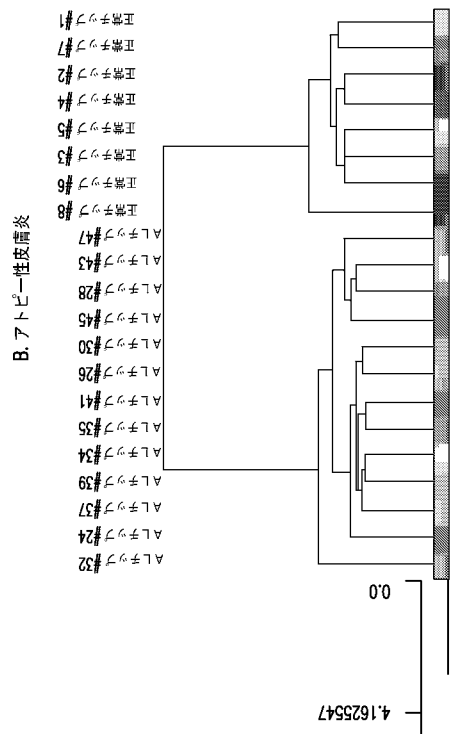


FIG. 30 continued

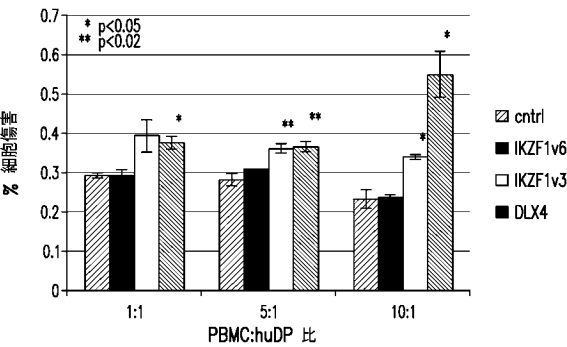
【図 3 1 A】



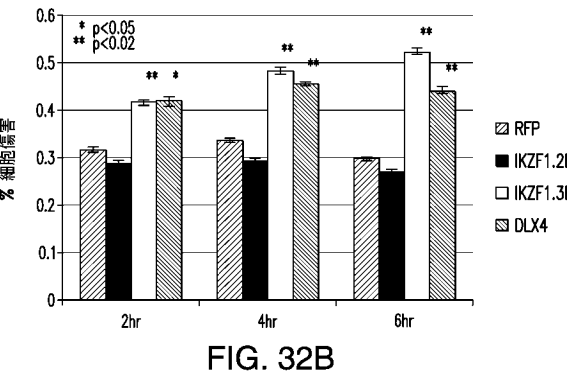
【図 3 1 B】



【図 3 2 A】



【図 3 2 B】



【図 3 3 - 1】

候補	座	位置	値	RDV	メタ	P
BTM	2q13	rs3789129	110940463			3.007E-07
BTM	2q13	rs12986962	111050981			0.00000872
CTLA4	2q33.2	rs1024161	203857029	0		
CTLA4	2q33.2	rs3096851	203899159	0		
IL2/IL21	4q27	rs7682241	122602720	0		
IL13/IL4	5q31.1	rs20541	132660272			
HLA	6p21.32	rs3130320	32255481			
HLA	6p21.32	rs3763312	32315077			
HLA	6p21.32	rs1689264	32408571			
HLA	6p21.32	rs3708375	32708375			
HLA	6p21.32	rs9275572	32711222			
ULBP	6q25.1	rs112857863	150015375	0		
ULBP	6q25.1	rs117934509	150017960	0		
ULBP	6q25.1	rs148198102	150021019	0		
ULBP	6q25.1	rs9479482	150038876	0		
ULBP	6q25.1	rs2009345	150068612	0		
ULBP	6q25.1	rs2501734	150069013	0		
STX17	9q31.1	rs10760706	99961410	0		
IL2RA	10p15.1	rs72650666	6024339	0		
IL2RA	10p15.1	rs3110470	6059750	0		
IL2RA	10p15.1	rs4147359	6066476	0		
IL2RA	10p15.1		1.73503E-12			1.457E-17
IL2RA	10p15.1		2.21753E-08			

FIG. 33

【図 3 3 - 2】

候補	座	マラベル (Row Label)	chr	位置	RDV	メタ P
PRDX5	11q13	rs694739	11	64329761		
GARP	11q13.5	rs2155219	11	76588150		
DGKA_RDV	コーディング	rs61756279	12	55951757		0.00002703
PNEL_RDV	コーディング	rs142410496	12	55957137		0 NL_001200053; c. T908C; p. L303P
PNEL_RDV	コーディング	rs141332969	12	55957413		0 NL_001200053; c. C632A; p. P211H
SUOX_RDV	コーディング	rs76537761	12	56004747		0 NL_001032387; c. G1358A; p. G453D
Eos	12q13	rs2292239	12	56088396	1.57E-08	2.71E-09
Eos	12q13	rs10783779	12	56090966	0	0
Eos	12q13	rs2069718	12	68156382	0	0
PLXNC1/SOCS2	12q13	rs7299099	12	94148083		0.000001951
LNK	12q24.12	rs653178	12	11156952		0.00003961
CLEC16A/SOCS1	16p13.13	rs3862469	16	11100223		3.313E-08
CLEC16A/SOCS1	16p13.13	rs8060821	16	11240202		
PTPN2	18p11.21	rs888270	18	12774895		
IL2RB	22q12.3	rs5756540	22	37186165		0.000003721

FIG. 33 continued

【図 3 4】

座	候補遺伝子	SNP	Chr	bp (Hg18)	A1A2	A _{risk}	P	OR _{risk}
6p21.32	HLA-DRB1	rs9275524	6	32,783,087	TC	C	2.E-60	1.91
10p15.1	IL15RA/IL2RA	rs3118470	10	6,141,719	TC	C	8.E-21	1.40
2q33.2	CTLA4/ICOS	rs231775	2	204,440,959	AG	G	2.E-20	1.39
6q25.1	ULBP3, ULBP6	rs12183587	6	150,396,301	TG	T	6.E-24	1.48
11q13	PRDX5	rs574087	11	63,859,534	AG	A	9.E-14	1.32
12q13	Eos, ERBB3	rs2292239	12	54,788,447	TG	T	4.E-09	1.25
4q27	IL21, IL2	rs7682481	4	123,743,476	CG	C	5.E-09	1.23
5q31.1	IL13, IL4	rs848	5	132,024,399	AC	A	5.E-09	1.27
2q13	ACOXL, BLM	rs3789129	2	111,414,511	AC	A	2.E-08	1.31
11q13.5	GARP	rs2155219	11	75,976,842	TG	T	4.E-08	1.21
1p13.2	PTPN22	rs2476601	1	114,79,091	AG	A	9.E-08	1.34
12q24.12	LNK, ATRX2	rs653178	12	110,492,139	TC	C	2.E-07	1.19
16p13.13	C11A, SOCS1	rs3862469	16	11,101,581	TC	C	2.E-07	1.21
9q31.1	STX17, NR4A3	rs10124366	9	101,727,524	AG	G	1.E-05	1.20

FIG. 34

【図 3 5】

ルキソリチニブ研究設計

- オープンラベルのパイロットシングアルーム研究
- 12人の患者（最初は10人）、2〜34年の疾患の期間
- 10の中等度から重度のバッチタイプAA, 2 AT/AU (s/p 変更)
- 3から6ヶ月間のルキソリチニブ20mg BIDを用いた処置
- 身体検査、SALTスコア及び写真によって、並びに、患者及び医師の評価スコアによって決定された毛髪再生により測定される有効性
- 応答の耐久性を評価するために処置後3ヶ月間追従された患者
- 免疫モニタリング及び分子研究のためにベースライン及び12週にて得られた生検及び末梢血。臨床的に示されるとして得られる追加の生検及び採取血液（1〜3と予測）
- ベースライン及び種々のさらなる時点にてQOL測定

FIG. 35

【図 3 6】

ルキソリチニブ研究状態

- 12人の対象者が登録—登録停止 (12 subjects enrolled—closed to enrollment)、研究活動進行中
- 全対象者が処置を完了。一部の対象者は、処置終了後12週の経過観察を完了し、少数の対象者は、依然として経過観察の段階にある。

FIG. 36

【図 3 7】

ルキソリチニブ応答

- 12人の患者のうち9人の患者が、SALTスコアによる少なくとも50%の再生主要評価基準を達成した。
- 応答は、1ヶ月という初期段階に見られる（わずかな斑状の再生）。再生は、斑状の再生の継続と共に着実に進行している。
- 1人のAT患者が、他のレスポナーと比較してより遅い再生を示した。

FIG. 37

【図 3 8】

Ruxoノンレスポナー

- 3人のノンレスポナー
- 応答の欠如を説明する明確な理由はなし
- 3人の患者全てがアフリカ系アメリカ人又はラテンアメリカ系のバックグラウンドを有する
 - 1人の対象者は、IL2TACにも応答しなかった
 - 1人の対象者の生検は、AAを証明したが、拡散パターン？FPHLを有した
 - 1人の対象者はMPHLを有したが、明確なバッチ(c/w AA)を示した

FIG. 38

【図 39 - 1】

ルキシリチニブ-SALTスコア

		対象者														
(%)		1	2	3	4	5*	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
時間 (週)	0	76	50	64	37	81	77	37	37.5	95	100	33	100			
	2															
	4	75	36	64	32	81	63	37	41	93	99	34	98.5			
	8	10	21	36.5	24	81	48	35	8.5	85	92	23	48.5			
	12	9	10	19	15	81	74	36	5.5	47.5	75	12.5	30			
	16	6	6.5	4	4		77		4	22	47	3	11			
	18															
	20	2		3	0				1	11	48	0	17.5			
	22		2									0				
	24			1.5						1.5	42	0	11.5			
	26	3.5			0											
	28		14.5								6					
	30			1						0.5						
	32		50		0											
	34															
	36									2						

FIG. 39

【図 39 - 2】

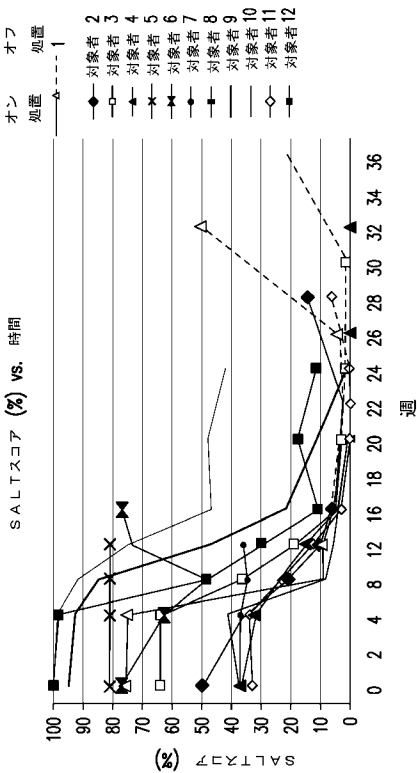


FIG. 39 continued

【図 40 - 1】

ルキシリチニブ%再生

		対象者														
% 再生		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
時間 (週)	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
	2	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A			
	4	1.3	28.0	0.0	13.5	0.0	18.2	0.0	-9.3	2.1	1.0	-3.0	1.5			
	8	86.8	58.0	43.0	35.1	0.0	37.7	5.4	77.3	10.5	8.0	30.3	51.5			
	12	88.2	80.0	70.3	59.5	0.0	3.9	27	85.3	50.0	25.0	62.1	70.0			
	16	92.1	87.0	93.8	88.2	#N/A	0.0	#N/A	89.3	76.8	53.0	90.9	89.0			
	18	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A			
	20	97.4	#N/A	95.3	100.0	#N/A	#N/A	#N/A	97.3	88.4	52.0	#N/A	82.5			
	22	#N/A	96.0	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	100.0	#N/A			
	24	#N/A	#N/A	97.7	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	98.4	98.4	58.0	100.0	83.5			
	26	95.4	#N/A	#N/A	100.0	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A			
	28	#N/A	71.0	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	81.8	#N/A			
	30	#N/A	#N/A	98.4	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	99.5	#N/A	#N/A	#N/A			
	32	34.2	#N/A	#N/A	100.0	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A			
	36	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	77.9	#N/A	#N/A	#N/A			

FIG. 40

【図 40 - 2】

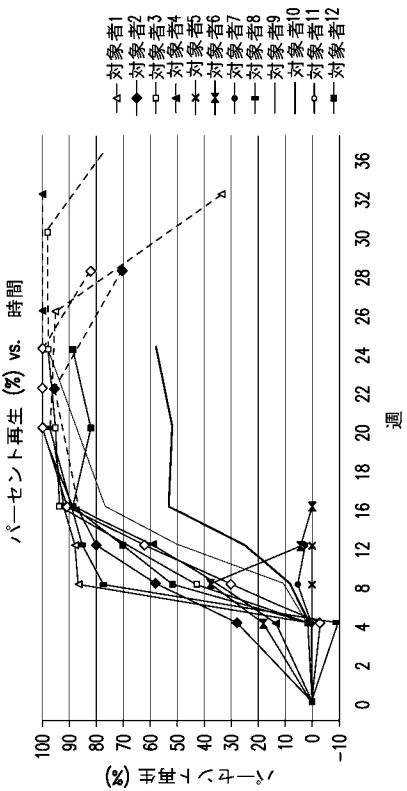


FIG. 40 continued

【図 4 1】

経口ルキシリチニブが、中程度／重度の円形脱毛症を臨床的に元に戻す
炎症性バイオマーカーの「オンターゲット」の反転
13人の患者の初期のデータのシングルアームオープンラベル研究

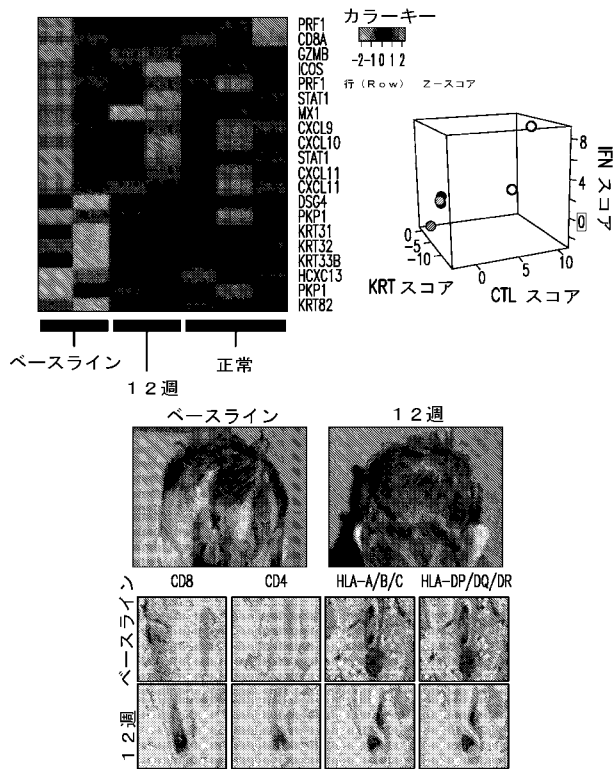


FIG. 41

【図 4 2】

ルキシリチニブ処置前後の遺伝子発現プロファイリング

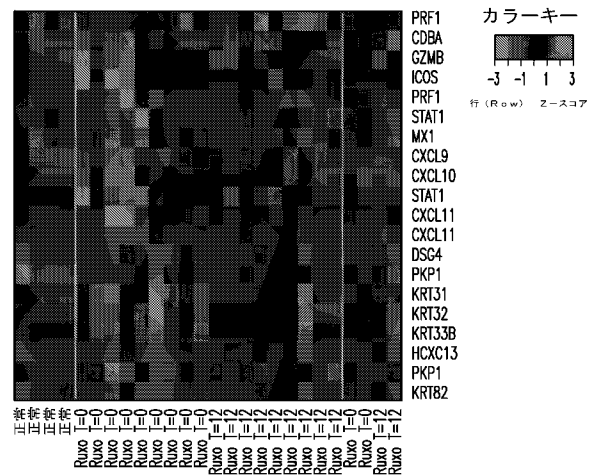


FIG. 42

【図 4 3 - 1】

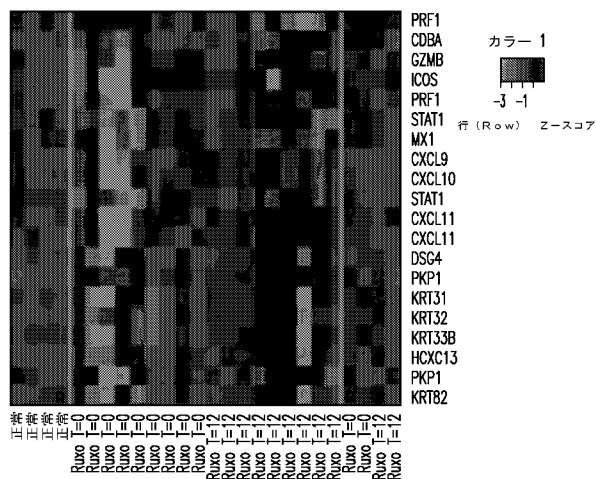


FIG. 43

【図 4 3 - 2】

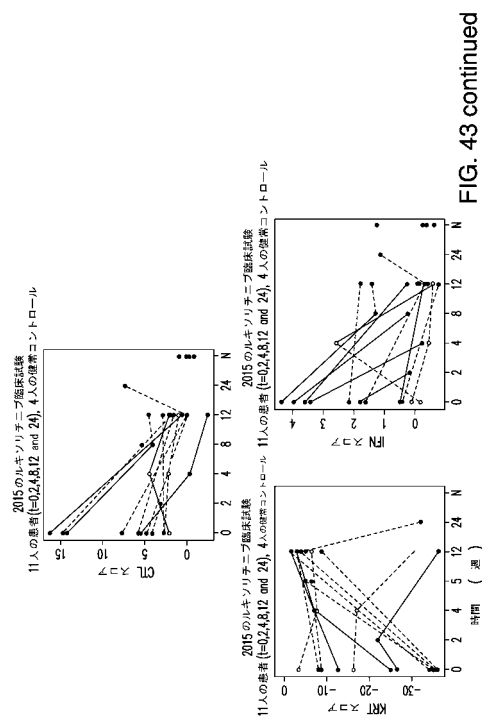


FIG. 43 continued

【図 4 4】

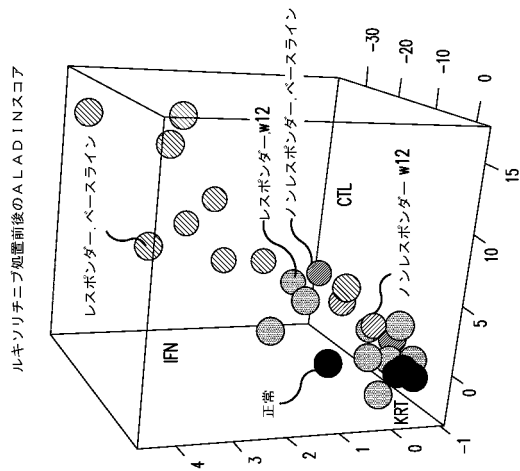


FIG. 44

【図 4 5】

トファシチニブ研究設計

オープンラベルのバイロットシングルアーム研究
n = 15 人の患者（中程度から重度の斑状の
AA 及び AT / AU
トファシニブ 5mg BID で 6 ヶ月まで処置
SALT スコア及び写真、患者及び身体評価の
スコア、生活の質
処置終了後 6 ヶ月の耐久性の期
(durability phase)
規定の時点での皮膚生検及び採取血液

FIG. 45

【图 4 6】

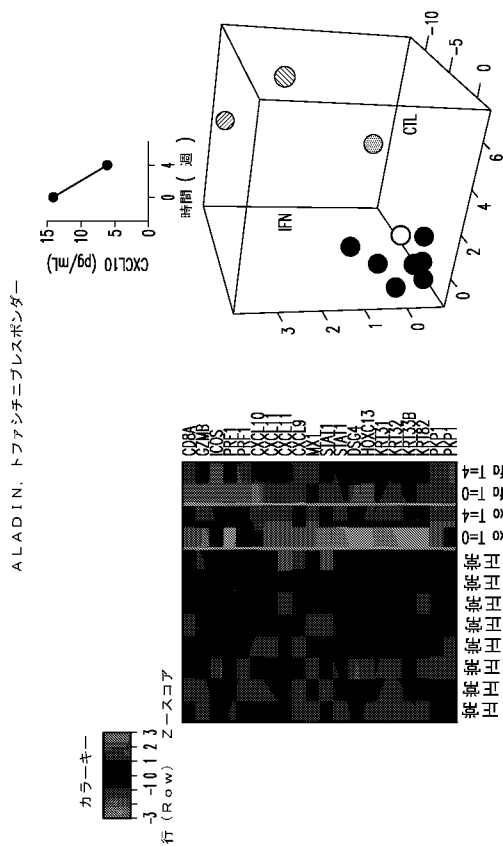


FIG. 46

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/47053

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/483, 33/487, 33/53; G12Q 1/68; A61Q 7/00 (2017.01) CPC - G01N 33/4833, 33/487, 33/53; C12Q 1/6883; A61Q 7/00 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) IPC(8): G01N 33/00, 33/48, 33/483, 33/487, 33/50, 33/53, 33/68; C12Q 1/68; A61Q 7/00 (2017.01); CPC: G01N 33/00, 33/48, 33/4833, 33/487, 33/50, 33/53, 33/5308, 33/68, 2800/60, 2800/56, 2800/24, 2800/20; C12Q 1/68, 1/6813, 1/686, 1/6883; A61Q 7/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data, RU, AT, CH, TH, BR, PH); Google Patents; Google; Google Scholar; PubMed; EBSco: identifi, detect, diagnos, alopecia areata, sever, level, progress, biomarker, gene expression signature, signature, sever, level, progress, IKZF1, IKAROS family zinc finger 1, IKAROS, DLX4, distal-less homeobox 4		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	(XING, L et al.) Alopecia Areata Is Driven by Cytotoxic T Lymphocytes and is Reversed by JAK Inhibition. Nature Medicine. 17 August 2014, Vol. 20, No. 9; pages 1043-1049; abstract; page 1, column 2, paragraph 8; page 2, column 2, paragraph 1; page 6, column 1, paragraph 1; figure 4d; figure 4h; figure 4i; figure 2 description; figure 3 description; figure 4d description; figure 4i description; figure 4h description; online methods, page 1, column 1, paragraph 5; supplementary note; page 7, paragraphs 1, 2; supplementary note, page 4, paragraph 2; supplementary note, page 5, paragraph 2; supplementary note, page 8, paragraph 4; supplementary note, page 10, paragraph 2; supplemental figure 15 description; DOI: 10.1038/nm.3645	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 6/4/1-3, 8/4/1-3, 9/8/4/1-3, 10/9/8/4/1-3, 11/9/8/4/1-3, 12/9/8/4/1-3, 13/8/4/1-3, 14/8/4/1-3, 16/8/4/1-3, 17/8/4/1-3, 18/8/4/1-3, 19/4/1-3, 20/19/4/1-3, 21/20/19/4/1-3, 22/20/19/4/1-3 — 7/4/1-3, 15/14/8/4/1-3, 23-24, 25/23-24, 26/23-24
Y	US 2013/0078244 A1 (CHRISTIANO, AM et al.) 28 March 2013; paragraphs [0013]-[0014], [0301], [0554]	7/4/1-3, 23-24, 25/23-24, 26/23-24
Y	(WESTRA, HJ et al.) Systematic Identification of Trans-eQTLs as Putative Drivers of Known Disease Associations. Nature Genetics. October 2013, Vol. 45, No. 10; pages 1238-1243; abstract; page 3, paragraph 4; DOI: 10.1038/ng.2756	15/14/8/4/1-3
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" 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 4 January 2017 (04.01.2017)		Date of mailing of the international search report 07 FEB 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/47053

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	(CHEN, JC et al.) Master Regulators of Infiltrate Recruitment in Autoimmune Disease Identified through Network-Based Molecular Deconvolution. Cell Systems. 25 November 2015, Vol 1, No. 5; pages 326-337; DOI: 10.1016/j.cels.2015.11.001	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 6/4/1-3, 7/4/1-3, 8/4/1-3, 9/8/4/1-3, 10/9/8/4/1-3, 11/9/8/4/1-3, 12/9/8/4/1-3, 13/8/4/1-3, 14/8/4/1-3, 15/14/8/4/1-3, 16/8/4/1-3, 17/8/4/1-3, 18/8/4/1-3, 19/4/1-3, 20/19/4/1-3, 21/20/19/4/1-3, 22/20/19/4/1-3, 23-24, 25/23-24, 26/23-24
P, X	(DESTEFANO, GM) Genetic Mechanisms Controlling Human Hair Growth. Columbia University. 2015 [retrieved on 22 December 2016]. PhD Dissertation [online]. DOI: 10.7916/D8TX3DKH	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 6/4/1-3, 7/4/1-3, 8/4/1-3, 9/8/4/1-3, 10/9/8/4/1-3, 11/9/8/4/1-3, 12/9/8/4/1-3, 13/8/4/1-3, 14/8/4/1-3, 15/14/8/4/1-3, 16/8/4/1-3, 17/8/4/1-3, 18/8/4/1-3, 19/4/1-3, 20/19/4/1-3, 21/20/19/4/1-3, 22/20/19/4/1-3, 23-24, 25/23-24, 26/23-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/47053

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

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

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***-Please see supplemental page-***-

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US18/47053

-----Continued from Box No. III: Observations Where Unity of Invention Is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1, 4 (in-part), 5 (in-part), 6 (in-part), 7 (in-part), 8 (in-part), 9 (in-part), 10 (in-part), 11 (in-part), 12 (in-part), 13 (in-part), 14 (in-part), 15 (in-part), 16 (in-part), 17 (in-part), 18 (in-part), 19 (in-part), 20 (in-part), 21 (in-part), 22 (in-part), 23, 25 (in-part) and 26 (in-part) are directed toward a method of treating Alopecia Areata (AA) in a subject comprising: (a) detecting a biomarker indicative of said disease severity and administering a therapeutic intervention to said subject appropriate to the identified disease severity.

Group II, Claims 2, 3, 4 (in-part), 5 (in-part), 6 (in-part), 7 (in-part), 8 (in-part), 9 (in-part), 10 (in-part), 11 (in-part), 12 (in-part), 13 (in-part), 14 (in-part), 15 (in-part), 16 (in-part), 17 (in-part), 18 (in-part), 19 (in-part), 20 (in-part), 21 (in-part), 22 (in-part), 24, 25 (in-part) and 26 (in-part) are directed toward a method of treating Alopecia Areata in a subject, comprising detecting a biomarker indicative of the propensity of a subject having AA to respond to JAK inhibitor treatment; and administering a JAK inhibitor to said subject.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include a biomarker indicative of disease severity, not present in Group II; the special technical features of Group II include a marker indicative of JAK responsiveness, not present in Group I.

Groups I and II share the technical features including: a method of treating Alopecia Areata (AA) in a subject comprising: (a) detecting a biomarker in said subject; and (b) administering an appropriate therapeutic intervention to said subject; and a kit for treating Alopecia Areata (AA) in a subject comprising (a) one or more detection reagents useful for detecting a biomarker of the subject, and (b) one or more treatment reagents useful for treating AA.

However, these shared technical features are previously disclosed by the article 'Reversal of Alopecia Areata Following Treatment with the JAK1/2 Inhibitor Baricitinib' by Jabbari et al. (hereinafter 'Jabbari').

Jabbari discloses a method of treating Alopecia Areata (AA) in a subject ((a method of) treating alopecia areata in a subject; abstract) comprising: (a) detecting a biomarker in said subject (detecting an interferon signature (a biomarker) in said subject; page 352, second column, fifth and sixth paragraphs; Figure 3A); and (b) administering an appropriate therapeutic intervention to said subject (administering baricitinib (an appropriate therapeutic intervention) to said subject; page 352, second column, fourth paragraph - sixth paragraph).

Jabbari does not disclose a kit for treating Alopecia Areata (AA) in a subject comprising (a) one or more detection reagents useful for detecting a biomarker of the subject, and (b) one or more treatment reagents useful for treating AA. However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have provided the necessary components for the detection of a marker signature, such as the interferon signature as disclosed by Jabbari, such as detection reagents useful for detecting said biomarker signature, as well as a treatment agent, such as baricitinib, as disclosed by Jabbari, in order to enable the accurate diagnosis of a form of alopecia areata treatable by baricitinib administration, and to provide said therapeutic agent for said treatment.

Since none of the special technical features of the Groups I and II inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Jabbari reference, unity of invention is lacking.

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 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	G 0 1 N 33/543	5 0 1 A
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813	Z N A Z
	C 1 2 Q 1/686	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 クリスティアーノ, アンジェラ
 アメリカ合衆国 0 7 4 3 0 ニュージャージー州, マファ, ジェイムズ・ブライト・サークル
 2 5

(72)発明者 クリンス, ラファエル
 アメリカ合衆国 1 0 9 9 4 ニューヨーク州, ウエストニャック, ヴァン・ハウトン 2 3 1

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ53 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02
 4C084 AA17 NA14 ZA891 ZC201

专利名称(译)	用于治疗斑秃的生物标志物		
公开(公告)号	JP2018526362A	公开(公告)日	2018-09-13
申请号	JP2018507599	申请日	2016-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学理事会		
申请(专利权)人(译)	哥伦比亚盐湖城在纽约市的受托人		
[标]发明人	クリスティアーノアンジェラ クリンスラファエル		
发明人	クリスティアーノ, アンジェラ クリンス, ラファエル		
IPC分类号	A61K45/00 A61P17/14 A61P43/00 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543 C12Q1/6813 C12Q1/686		
CPC分类号	A61P17/14 A61P43/00 G01N33/564 C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/5008 G01N2333/4703 G01N2333/555 G01N33/5023 G01N2800/52 G01N2800/56 G01N2800/60		
FI分类号	A61K45/00 A61P17/14 A61P43/00.111 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N33/543.501. A C12Q1/6813.ZNA.Z C12Q1/686.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/ /QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA891 4C084/ZC201		
代理人(译)	伊藤忠彦		
优先权	62/205476 2015-08-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开内容的主题涉及生物标记物，其能够改善斑秃的诊断和预后，以及对该疾病的有效治疗，以及鉴定对这种治疗有反应的患者亚群的能力。结合有生物标志物的方法，以及结合具有跟踪此类治疗进展能力的生物标志物的方法。

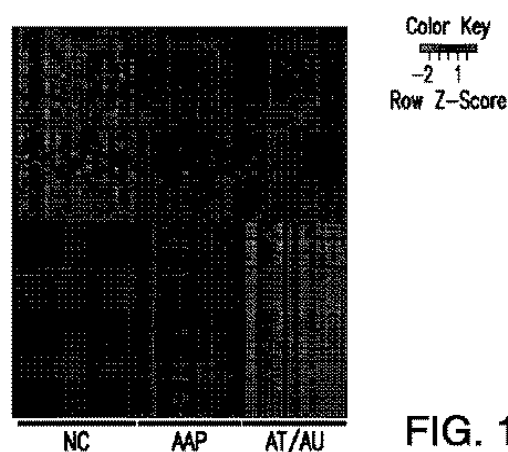


FIG. 1A