

Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物における呼吸器感作を誘導することができる薬剤を特定する方法であって、

a) 樹状細胞のある集団または樹状様細胞のある集団を試験薬に曝露するステップと

b) 前記細胞において、表 A (i) 及び／または表 A (i i) に定義される群から選択される 1 つ以上のバイオマーカーの発現量を測定するステップと、を含むか、またはそれからなり、

ステップ (b) で測定された前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記細胞における発現量が、前記試験薬の呼吸器感作効果を示す、前記方法。

10

【請求項 2】

c) 前記樹状細胞または前記樹状様細胞の別個の集団を、哺乳動物において呼吸器感作物質ではない 1 つ以上の陰性対照薬に曝露することと、

d) 前記細胞において、ステップ (b) で測定された前記 1 つ以上のバイオマーカーの発現量を測定することと、をさらに含み、

ステップ (d) で測定された前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記試験試料中の存在及び／または量が、ステップ (b) で測定された前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記対照試料中の存在及び／または量とは異なる場合に、前記試験薬が呼吸器感作物質と特定される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

e) 前記樹状細胞または前記樹状様細胞の別個の集団を、哺乳動物において呼吸器感作物質である 1 つ以上の陽性対照薬に曝露することと、

f) 前記細胞において、ステップ (b) で測定された前記 1 つ以上のバイオマーカーの発現量を測定することと、をさらに含み、

ステップ (f) で測定された前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記試験試料中の存在及び／または量が、ステップ (b) で測定された前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記陽性対照試料中の存在及び／または量に相当する場合に、前記試験薬が呼吸器感作物質と特定される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ (b) が、表 A (i i) に定義される 1 つ以上のバイオマーカー、例えば、表 1 A に定義されるバイオマーカーのうちの少なくとも 2 つまたは 3 つの発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 5】

ステップ (b) が、TNFRSF19 の発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ (b) が、SNORA74A の発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (b) が、SPAM1 の発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 8】

ステップ (b) が、TNFRSF19、SNORA74A、及び SPAM1 の発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ (b) が、ステップ (b) で、表 A (i i) に定義される 1 つ以上のバイオマーカー、例えば、表 A (i i) に定義されるバイオマーカーのうちの 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、3

50

4、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、または342個の発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

【請求項10】

ステップ(b)が、表A(i i)に定義されるバイオマーカーのすべての発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

ステップ(b)が、表A(i i i)に定義されるバイオマーカーのうちの1つ以上、例えば、表A(i i i)に定義されるバイオマーカーのうちの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、または44個の発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項12】

ステップ(b)が、表A(i i i)に定義されるバイオマーカーのすべての発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

ステップ(b)が、表Aに定義されるバイオマーカーのすべての発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

ステップ(b)が、前記1つ以上のバイオマーカーをコードする核酸分子の発現量を測

50

定することを含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸分子が、cDNA 分子または mRNA 分子である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記核酸分子が、mRNA 分子である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記核酸分子が、cDNA 分子である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ (b) での前記 1 つ以上のバイオマーカーの発現量の測定が、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、逆転写酵素 PCR (RT-PCR)、定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)、ナノアレイ、マイクロアレイ、マクロアレイ、オートラジオグラフィー、及びインサイトハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法を使用して行われる、請求項 14 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 19】

ステップ (b) での前記 1 つ以上のバイオマーカーの発現量の測定が、DNA マイクロアレイを使用して決定される、請求項 14 ～ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

ステップ (b) での前記 1 つ以上のバイオマーカーの発現量の測定が、1 つ以上の結合部分を使用して行われ、前記 1 つ以上の結合部分の各々が、表 A に特定されるバイオマーカーのうちの 1 つをコードする核酸分子に選択的に結合することができる、請求項 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記 1 つ以上の結合部分が各々、核酸分子を含むか、またはそれからなる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記 1 つ以上の結合部分が各々、DNA、RNA、PNA、LNA、GNA、TNA、または PMO を含むか、またはそれからなる、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 1 つ以上の結合部分が各々、DNA を含むか、またはそれからなる、請求項 20 または 22 に記載の方法。

30

【請求項 24】

前記 1 つ以上の結合部分が、5 ～ 100 ヌクレオチド長である、請求項 21 ～ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記 1 つ以上の核酸分子が、15 ～ 35 ヌクレオチド長である、請求項 21 ～ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記結合部分が、検出可能な部分を含む、請求項 21 ～ 26 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 27】

前記検出可能な部分が、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射性部分 (例えば、放射性原子)、または酵素部分からなる群から選択される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記検出可能な部分が、放射性原子を含むか、またはそれからなる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

前記放射性原子が、テクネチウム-99m、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、リン-32、硫黄-35、重水素、三重水素、レニウム-186、レニウム-188、及

50

びイットリウム-90からなる群から選択される、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記結合部分の前記検出可能な部分が、蛍光部分である、請求項27に記載の方法。

【請求項31】

ステップ(b)が、ステップ(b)に定義される前記1つ以上のバイオマーカーのタンパク質の発現量を測定することを含むか、またはそれからなる、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

ステップ(b)での前記1つ以上のバイオマーカーの発現量の測定が、各々表Aに特定されるバイオマーカーのうちの1つに選択的に結合することができる1つ以上の結合部分を使用して行われる、請求項31に記載の方法。

10

【請求項33】

前記1つ以上の結合部分が、抗体またはその抗原結合断片を含むか、またはそれからなる、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記抗体または前記抗原結合断片が、インタクトな抗体、Fv断片(例えば、一本鎖Fv及びジスルフィド結合Fv)、Fab様断片(例えば、Fab断片、Fab'断片、及びF(ab)₂断片)、単一可変ドメイン(例えば、V_Hドメイン及びV_Lドメイン)、ならびにドメイン抗体(dAb、単一形式及び二重形式[すなわち、dAb-リンカー-dAb])を含む)からなる群から選択される、請求項33または34に記載の方法。

20

【請求項36】

前記抗体または前記抗原結合断片が、一本鎖Fv(scFv)である、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記1つ以上の結合部分が、抗体様結合剤、例えば、アフィボディまたはアプタマーを含むか、またはそれからなる、請求項32に記載の方法。

【請求項38】

前記1つ以上の結合部分が、検出可能な部分を含む、請求項32～37のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項39】

前記検出可能な部分が、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射性部分、及び酵素部分からなる群から選択される、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

ステップ(b)が、アレイを使用して行われる、請求項1～39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項41】

前記アレイが、ビーズベースのアレイである、請求項40に記載の方法。

40

【請求項42】

前記アレイが、表面ベースのアレイである、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記アレイが、マクロアレイ、マイクロアレイ、ナノアレイからなる群から選択される、請求項40～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

請求項1～43のいずれか一項に記載の方法で使用するためのアレイであって、請求項20～30及び32～39のいずれか一項に定義される1つ以上の第1の結合剤を含む、前記アレイ。

【請求項45】

50

表 1 に定義されるバイオマーカーのすべてに集合的に結合することができる結合剤を含む、請求項 4 4 に記載のアレイ。

【請求項 4 6】

前記第 1 の結合剤が固定化される、請求項 4 4 または 4 5 に記載のアレイ。

【請求項 4 7】

呼吸器過敏性応答を誘導することができる薬剤を特定するための、請求項 1 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記過敏性応答が、体液性過敏性応答である、請求項 1 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記過敏性応答が、I 型過敏性応答である、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

呼吸器アレルギーを誘導することができる薬剤を特定するための、請求項 1 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記樹状細胞集団または前記樹状様細胞集団が、樹状様細胞集団である、請求項 1 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記樹状様細胞が、骨髄樹状様細胞である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記骨髄樹状様細胞が、骨髄樹状細胞に由来する、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

骨髄樹状細胞に由来する前記細胞が、骨髄性白血病由来の細胞である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記骨髄性白血病由来の細胞が、KG-1、THP-1、U-937、HL-60、Monomac-6、AML-193、及びMUTZ-3からなる群から選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記樹状様細胞が、MUTZ-3 細胞である、請求項 1 ～ 4 3 及び 4 7 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

ステップ(c)で提供される前記 1 つ以上の陰性対照薬が、1-ブタノール、2-アミノフェノール、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ニトロ-1, 4-フェニレンジアミン、4-アミノ安息香酸、クロロベンゼン、ジメチルホルムアミド、エチルバニリン、ホルムアルデヒド、ゲラニオール、ヘキシルシンナムアルデヒド、イソプロパノール、カトンCG※、サリチル酸メチル、ペニシリンG、プロピレングリコール、二クロム酸カリウム、過マンガン酸カリウム、Tween 80、及び硫酸亜鉛からなる群から選択される、請求項 2 ～ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

少なくとも 2 つの対照非感作薬、例えば、少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または少なくとも 20 個の対照非感作薬が提供される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

ステップ(e)で提供される前記 1 つ以上の陽性対照薬が、ヘキサクロロ白金酸アンモニウム、過硫酸アンモニウム、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、無水マレイン酸、メチレンジフェノールジイソシアネート、無水フタル酸、トルエンジイソシアネート、及び無水トリメリット酸からなる群から選択される 1 つ以上の薬剤を含むか、またはそれからなる、請求項 3 ～ 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 60】

少なくとも2つの対照感作薬、例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、または少なくとも10個の対照感作薬が提供される、請求項59に記載の方法。

【請求項 61】

前記方法が、試験される前記試料の感作効力を示す、請求項1～44及び47～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

請求項1～44及び47～61のいずれか一項に記載の方法で使用するためのアレイであって、請求項20～30及び32～39のいずれか一項に定義される1つ以上の結合部分を含む、前記アレイ。

10

【請求項 63】

前記結合部分が、表A(i)に定義されるバイオマーカーのすべてに結合することができる、請求項62に記載のアレイ。

【請求項 64】

前記結合部分が、表A(ii)に定義されるバイオマーカーのすべてに結合することができる、請求項62または63に記載のアレイ。

【請求項 65】

前記結合部分が、表A(iii)に定義されるバイオマーカーのすべてに結合することができる、請求項62、63、または64に記載のアレイ。

【請求項 66】

前記結合部分が、表Aに定義されるバイオマーカーのすべてに結合することができる、請求項62～65のいずれか一項に記載のアレイ。

20

【請求項 67】

前記結合部分が固定化される、請求項62～65のいずれか一項に記載のアレイ。

【請求項 68】

呼吸器過敏性応答感作薬を特定するための、表Aに定義される群から選択される2つ以上のバイオマーカーの併用。

【請求項 69】

表Aに定義されるバイオマーカーのすべてが、過敏性応答感作薬を特定するために集合的に使用される、請求項68に記載の使用。

30

【請求項 70】

呼吸器過敏性応答感作薬を特定するための、請求項20～30または32～39のいずれか一項に定義される1つ以上の結合部分の使用。

【請求項 71】

表Aに定義されるバイオマーカーのすべてが、過敏性応答感作薬を特定するために集合的に使用される、請求項70に記載の使用。

【請求項 72】

請求項1～61のいずれか一項に記載の方法で使用するための分析キットであって、

A) 請求項62～67のいずれか一項に記載のアレイ及び／または請求項20～30もしくは32～39のいずれか一項に定義される1つ以上の結合部分と、

40

B) 任意に、請求項1～60のいずれか一項に定義される方法を行うための指示と、を含む、前記キット。

【請求項 73】

1つ以上の対照試料をさらに含む、請求項72に記載の分析キット。

【請求項 74】

1つ以上の非感作薬を含む、請求項73に記載の分析キット。

【請求項 75】

1つ以上の感作薬を含む、請求項72、73、または74に記載の分析キット。

【請求項 76】

患者における呼吸器I型過敏性反応（呼吸器喘息等）を治療または予防する方法であっ

50

て、

(a) 前記患者が曝露されるか、または曝露されている1つ以上の試験薬を提供するステップと、

(b) 本発明の第1の態様に提供される方法を使用して、ステップ(a)で提供された前記1つ以上の試験薬が呼吸器感作物質であるかを決定するステップと、

(c) 1つ以上の試験薬が呼吸器感作物質と特定された場合、前記患者の、呼吸器感作物質と特定された前記1つ以上の試験薬への曝露を低減もしくは予防し、かつ／または感作症状に適切な治療を提供するステップと、を含む、前記方法。

【請求項77】

感作症状の前記治療が、短時間作用型ベータ2-アドレナリン受容体作動薬(SABA)(サルブタモール等)、抗コリン薬(臭化イプラトロピウム等)、他のアドレナリン作動薬(吸入エピネフリン等)、コルチコステロイド(ベクロメタゾン等)、長時間作用型ベータ-アドレナリン受容体作動薬(LABA)(サルメテロール及びフォルモテロール等)、ロイコトリエン拮抗薬(モンテルカスト及びザフィルルカスト等)、ならびに／またはマスト細胞安定剤(クロモリンナトリウム等)からなる群から選択される、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

本発明の第1の態様に定義される方法を行うためのコンピュータプログラム。

【請求項79】

前記コンピュータプログラムが、コンピュータ可読担体に記録される、請求項78に記載のコンピュータプログラム。

【請求項80】

本明細書に実質的に記載される方法または使用。

【請求項81】

本明細書に実質的に記載されるアレイ、キット、またはコンピュータプログラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、呼吸器感作を誘導することができる薬剤を特定するための方法、ならびにかかる方法で使用するためのアレイ及び分析キットに関する。

【背景技術】

【0002】

呼吸器感作は、環境タンパク質またはある特定の低分子量(LMW)化学化合物に対する免疫応答によって引き起こされる上部呼吸管及び下部呼吸管のアレルギー性I型過敏性反応である。喘鳴、気管支収縮、及び喘息発作等の呼吸器感作の臨床症状は、同じ化合物への繰り返しの曝露時に影響を受けやすい以前に感作されている個体に発症する[1]。機構的に、呼吸器感作は、CD4+Th2細胞の活性化により開始され、アレルゲン特異的IgE抗体の産生の増加によるBリンパ球の分化により媒介される[1~3]。

【0003】

呼吸器アレルギーが一般にタンパク質アレルゲンによって誘導される一方で、LMW化学化合物は、CD8+T細胞及びCD4+Th1細胞を伴うIV型過敏性反応の誘導、ならびにアレルギー性接触皮膚炎(ACD)等の皮膚状態の発病に主に関連している。しかしながら、ある特定のクラスのLMW化学化合物、例えば、ジイソシアネート[4]、無水酸[5]、白金塩[6]、反応染料[7]、及びクロラミンT[8]は、呼吸管を感作させる場合もある。これらのLMW化学化合物への曝露は、一般に職業環境に限定されており、長期間の曝露の繰り返しにより、最終的には職業性喘息(OA)の発症という結果になり得る[3、9]。接触皮膚炎を引き起こすものと比較して、より少ない数の化学物質しか呼吸器アレルギーを引き起こすものとして知られていない(100未満の物質しか知られていない)[10]が、健康への影響は、依然として悲慘的であり得る。例えば、後天性OAにより、慢性炎症、気道過応答性[11]、大規模な気道リモデリング[12

10

20

30

40

50

」がもたらされ、それ故に、罹患した個体の生活の質に重大な影響を及ぼし得る。O Aに関連した重大な健康への影響、ならびに作業環境への新たな化合物（例えば、清浄剤及び健康管理製品〔9、13～15〕）の導入により、潜在的な呼吸器感作物質の危険分類のための正確かつ信頼できる試験戦略の必要性が強調されている。したがって、これらの化合物の積極的な特定及び特徴付けは、依然として非常に重要な分野である。

【0004】

しかしながら、この点における課題は、呼吸器感作を誘導する化学物質のリスクを評価するための方法が十分に開発されていないことである〔16〕。現在のアプローチは、インビボ試験戦略もインビトロ試験戦略もいずれも必要とする。最近まで、本分野は、動物ベースのインビボモデルに依存していた。これらの動物ベースのアプローチのうち、モルモット試験〔17〕、マウスIgE試験〔18、19〕、ラットIgE試験〔20、21〕、及びマウスサイトカインフィンガープリンティング〔22、23〕が、最も注目を集めている。加えて、呼吸器感作物質を皮膚感作物質と区別するために、いくつかの化学的に誘導された喘息のマウスモデルについて、文献に記載されている〔24、25〕。これらのアプローチが現在の呼吸器感作の発症に関連した免疫生物学的機構及び細胞過程の理解に明らかに貢献しているが、これらの方法のいずれも規制目的で日常的なアッセイとして使用するのに十分に信頼できるものと証明されていない。さらに、スクリーニング手段としての動物ベースの方法の使用に関連したかなりの経済的及び倫理的欠点が存在する。

【0005】

したがって、Directive 201/63/EUに述べられている動物実験の減少、改良、及び代用という3大Rの原理と相関する呼吸器感作のための細胞ベースのインビトロアッセイの開発に相当な努力がなされている〔26〕。最近の細胞ベースのアプローチは、感作過程の異なる段階のモデルとして、樹状細胞株THP-1〔27〕ならびに上皮細胞株BEAS-2B〔28〕及びA549等の単一細胞株の使用を必要としている〔29〕。呼吸器感作物質への曝露のインビボ経路を模倣するより高度な試みも、ヒト気道上皮の三次元細胞モデルとしてEpithelixによって開発された市販のMucilAir（商標）を使用して行われている〔30〕。加えて、化学反応性に基づく非細胞ベースのインシリコ予測モデルが呼吸器感作において探索されている〔31〕。

【0006】

呼吸器感作アッセイの欠如とは対照的に、文献は、皮膚感作化学物質の特定のためのいくつかの予測モデル（〔34〕に概説されている）について記載しており、動物ベースの局所リンパ節アッセイ（LLNA）〔35〕が歴史的に好ましい方法である。いくつかのインビトロモデルは、ヒト細胞株活性化試験（h-CLAT）〔36、37〕、直接ペプチド活性化試験（DRPA）〔38〕、及びKeratinosens（登録商標）試験等の皮膚感作の終点についても記載されている〔39、40〕。近年、我々は、これらの方法に代わる正確な代替物として、社内で開発されたゲノムアレルゲン迅速検出（GARD）〔41、42〕インビトロアッセイも公開した。GARDアッセイは、トランスクリプトーム規模でのDNAマイクロアレイ技術を使用したヒト骨髓細胞株MUTZ-3〔43～45〕中の200個の遺伝子を含むゲノムバイオマーカーシグネチャー（GARD予測シグネチャーまたはGPS）の転写レベルの測定に基づく。26個の盲検化合物及び11個の非盲検化合物を含むコホートを使用して、予測性能の観点でのGARDアッセイの機能性を最近の研究で評価した。このアッセイの精度は89%〔46〕と推定され、LLNAの場合の72%〔47〕と比較することができる。LLNA等の皮膚感作アッセイが呼吸器感作物質を分類するためにも適用されることが提案されているため、皮膚感作モデルは興味深いものである〔48、49〕。LLNAアッセイにおける終点は、マウスの試験化学物質への局所曝露時の排出リンパ節で測定された誘発された増殖応答である〔50、51〕。しかしながら、この増殖応答は、呼吸器感作物質及び皮膚感作物質の両方によって誘導される。その結果として、感作物質を非感作物質と層別するためにLLNAが使用され得る一方で、LLNAは、皮膚感作物質と呼吸器感作物質を正確に区別することができない〔1〕。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、呼吸器感作物質を明確に特定するための正確かつ信頼できるインビトロアッセイの確立が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、動物試験に代わる新規の代替物としての、ゲノムバイオマーカーシグネチャーに基づく呼吸器感作物質の評価のための細胞ベースの試験戦略に関する。我々は、細胞の完全なトランスクリプトームの分析によってもたらされる多用途性を大いに利用し、GARDアッセイの概念を拡大適用して、GARD呼吸器予測シグネチャー（GRPS）と呼ばれる別個のゲノムバイオマーカーシグネチャーの特定による呼吸器感作物質の予測を含んだ。その使用により、呼吸器感作物質を分類することができる。特定されたバイオマーカーシグネチャーの目的とする用途は、皮膚感作化学物質の分類のためにGPSと併用される。それ故に、GARD概念は、未知の化学物質の皮膚呼吸器感作特性及び呼吸器感作特性の両方のリスク評価及び危険分類のために同時に使用され得る試験プラットフォームの極めてまれな機会を示す。

【0009】

したがって、本発明の第1の態様は、哺乳動物における呼吸器感作を誘導することができる薬剤を特定するための方法であって、

a) 樹状細胞のある集団または樹状様細胞のある集団を試験薬に曝露するステップと、

b) それらの細胞において、表Aに定義される群から選択される1つ以上のバイオマーカーの発現量を測定するステップと、を含むか、またはそれからなり、ステップ(b)で測定された1つ以上のバイオマーカーのそれらの細胞における発現量が、試験薬の呼吸器感作効果を示す、方法を提供する。

【0010】

「試験薬の呼吸器感作効果を示す」とは、その試験薬が呼吸器感作物質であるか否かを決定し、かつ／またはその試験薬の呼吸器感作物質としての効力を決定することを含む。

【0011】

「呼吸器感作を誘導することができる薬剤」とは、哺乳動物の呼吸管におけるI型即時型過敏性反応を誘導及び誘発することができる任意の薬剤を含む。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。好ましくは、I型即時型過敏性反応は、DC媒介型であり、かつ／またはT細胞のTh2細胞への分化を伴う。好ましくは、I型即時型過敏性反応は、体液性免疫及び／または呼吸器アレルギーをもたらす。

【0012】

哺乳類肺の誘導区域は、気管、気管支、細気管支、及び終末細気管支を含む。呼吸器区域は、呼吸細気管支、肺胞管、及び肺胞を含む。誘導区域は、気道で構成されており、血液とのガス交換がなく、気道を開いた状態で保持するために軟骨で補強されている。誘導区域は、吸入空気を加湿し、それを37°C(99°F)まで加温する。誘導区域はまた、すべての通路の壁上に位置する繊毛により粒子を除去することによって吸入空気を浄化する。呼吸器区域は、血液とのガス交換の部位である。

【0013】

一実施形態では、「哺乳類皮膚の感作を誘導することができる薬剤」とは、哺乳動物における肺上皮のある部位でI型即時型過敏性反応を誘導及び誘発することができる薬剤である。好ましくは、肺上皮のその部位は、肺の呼吸器区域内にあるが、代わりにまたは加えて、肺の誘導区域内にあってもよい。

【0014】

好ましくは、本方法は、インビトロ方法またはエキスビボ方法である。

【0015】

哺乳動物は、任意のペットまたは家畜であってもよい。好ましくは、哺乳動物は、ラッ

ト、マウス、モルモット、ネコ、イヌ、ウマ、または霊長類である。最も好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

【0016】

樹状細胞（DC）は、哺乳類免疫系の一部を形成する免疫細胞である。それらの主な機能は、抗原物質を処理し、それを、その表面上で、先天性免疫系と適応性免疫系をつなぐ免疫系の他の細胞に提示する（すなわち、それらは、抗原提示細胞として機能する）ことである。

【0017】

樹状細胞は、（ランゲルハンス細胞と呼ばれる特殊の樹状細胞型が存在する）皮膚等の外部環境と接触している組織、ならびに鼻、肺、胃、及び腸の内層に存在する。それらは、血液中の未熟状態の細胞でも見つけることができる。活性化されると、それらは、それらがT細胞及びB細胞と相互作用するリンパ節に移動して、適応性免疫応答を開始し、形作る。ある特定の発達段階で、それらは、分岐状の突起である樹状突起を生育する。外観は似ているが、これらは、神経細胞の樹状突起とははっきり異なる構造である。未熟な樹状細胞は、それらが樹状突起ではなく大きな細胞質「ベール」を処理するため、ベール細胞とも呼ばれる。

【0018】

「樹状様細胞」とは、樹状細胞に特異的な機能的特性及び表現型特性、例えば、形態学的特徴、共刺激分子及びMHCクラスII分子の発現、巨大分子を飲作用する能力、ならびに静止しているT細胞を活性化する能力を呈する非樹状細胞を意味する。

【0019】

一実施形態では、樹状様細胞は、CD34⁺樹状細胞前駆体である。任意に、CD34⁺樹状細胞前駆体は、サイトカイン刺激時に、CD1dを介して抗原を提示する表現型MHCクラスI及びII（すなわち、未熟な樹状細胞またはランゲルハンス様樹状細胞と同様の表現型）を獲得し、特異的T細胞増殖を誘導し、かつ／または炎症性メディエーターでの刺激時に成熟した転写プロファイル及び表現型プロファイルを呈することができる。

【0020】

樹状細胞は、機能、表現型、及び／または遺伝子発現パターン、具体的には細胞表面表現型によって認識され得る。これらの細胞は、それらの特有の形態、高レベルの表面MHCクラスII発現、ならびに抗原をCD4⁺T細胞及び／またはCD8⁺T細胞、具体的にはナイーブT細胞に提示する能力を特徴とする（Steinman et al. (1991) Ann. Rev. Immunol. 9:271）。

【0021】

特徴的なベール様突起を有する樹状細胞の細胞表面は独特であり、細胞表面マーカーCD11c及びMHCクラスIIの発現を特徴とする。大半のDCは、T細胞、B細胞、単球／マクロファージ、及び顆粒球等の他の白血球系統のマーカーには陰性である。樹状細胞の下位集団は、33D1、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CD1a-d、CD4、CD5、CD8アルファ、CD9、CD11b、CD24、CD40、CD48、CD54、CD58、CD80、CD83、CD86、CD91、CD117、CD123（IL3Ra）、CD134、CD137、CD150、CD153、CD162、CXCR1、CXCR2、CXCR4、DCIR、DC-LAMP、DC-SIGN、DEC205、E-カドヘリン、ランゲリン、マンノース受容体、MARCO、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR9、CD14、CD34、HLA-DR、及びいくつかのレクチンからなる群から選択されるさらなるマーカーも発現し得る。

【0022】

これらの細胞表面マーカーの発現パターンは、樹状細胞の成熟度、それらの組織起源、及び／またはそれらの種起源によって異なり得る。未熟な樹状細胞は、低レベルのMHCクラスIIしか発現しないが、抗原タンパク質をエンドサイトーシスにより取り込み、かつそれらを処理してMHCクラスII分子との複合体に提示することができる。活性化さ

10

20

30

40

50

れた樹状細胞は、高レベルのMHCクラス11、ICAM-1、及びCD86を発現し、同種異系ナイーブT細胞の増殖を、例えば、混合白血球反応（MLR）において刺激することができる。

【0023】

機能的には、樹状細胞または樹状様細胞は、抗原提示を決定するための任意の簡便なアッセイによって特定され得る。かかるアッセイは、試験抗原の提示による抗原刺激T細胞及び／またはナイーブT細胞を刺激する能力の試験、続いて、T細胞増殖、IL-2放出等の決定を含み得る。

【0024】

一実施形態では、樹状様細胞は、上皮細胞及び／または上皮様細胞、例えば、BEAS-2B [28]、WT9-7、及びA549を含む [29]。好ましくは、上皮細胞は、肺上皮細胞である。好ましくは、上皮様細胞は、肺上皮様細胞である。代替の実施形態では、樹状様細胞は、上皮細胞及び／または上皮様細胞を含む。

【0025】

「発現量」とは、mRNAまたはタンパク質等の遺伝子産物のレベルまたは量を意味する。

【0026】

タンパク質及び／または核酸の濃度を検出及び／または測定する方法が当業者に周知であり、例えば、Sambrook and Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。

【0027】

タンパク質検出及び／または測定の好ましい方法としては、ウエスタンブロット、ノーズウエスタンブロット、免疫吸着剤アッセイ（ELISA）、抗体マイクロアレイ、組織マイクロアレイ（TMA）、免疫沈降、インサイツハイブリダイゼーション及び他の免疫組織化学技法、放射免疫アッセイ（RIA）、免疫放射定量アッセイ（IRMA）、ならびに免疫酵素アッセイ（IEMA）、例えば、モノクローナル抗体及び／またはポリクローナル抗体を使用したサンドイッチアッセイが挙げられる。例示のサンドイッチアッセイは、Davidらにより参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,376,110号及び同第4,486,530号に説明されている。スライド上での細胞の抗体染色は、細胞学研究室診断試験においてよく知られており、当業者にもよく知られている方法で使用され得る。

【0028】

典型的には、ELISAは、通常固相アッセイにおいて着色された反応生成物をもたらす酵素の使用を必要とする。西洋ワサビペルオキシダーゼ及びホスファターゼ等の酵素が広く用いられている。ホスファターゼ反応の増幅法は、基質としてNADPを使用してNADを生成することであり、これは、第2の酵素系の補酵素としての役割を果たすようになる。大腸菌由来のピロホスファターゼは、この酵素が組織中に存在せず、安定しており、かつ良好な反応色をもたらすため、良好な接合体を提供する。ルシフェラーゼ等の酵素に基づく化学発光系も使用することができる。

【0029】

ビタミンであるビオチンとの接合が頻繁に使用されており、ビオチンとの接合が、それが高度の特異性及び親和性で結合する酵素結合アビジンまたはストレプトアビジンとのその反応によって容易に検出され得るためである。

【0030】

核酸（例えば、mRNA）の好ましい検出及び／または測定方法としては、サザンブロット、ノーザンブロット、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素PCR（RT-PCR）、定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）、ナノアレイ、マイクロアレイ、マクロアレイ、オートラジオグラフィー、及びインサイツハイブリダイゼーションが挙げられる。

【0031】

一実施形態では、本方法は、

c) 樹状細胞または樹状様細胞の別個の集団を、哺乳動物において呼吸器感作物質ではない1つ以上の陰性対照薬に曝露するステップと、

d) それらの細胞において、ステップ(b)で測定された1つ以上のバイオマーカーの発現量を測定するステップと、をさらに含み、

ステップ(b)で測定された1つ以上のバイオマーカーの試験試料中の存在及び／または量が、ステップ(d)で測定された1つ以上のバイオマーカーの対照試料中の存在及び／または量とは異なる場合に、試験薬が呼吸器感作物質と特定される。

【0032】

「ステップ(b)で測定された1つ以上のタンパク質の対照試料中の存在及び／または量とは異なる」とは、試験試料中の存在及び／または量が、統計的に有意な様式で、1つ以上の陰性対照試料中の存在及び／または量とは異なることを意味する。好ましくは、試験薬に曝露された細胞集団における1つ以上のバイオマーカーの発現量は、

陰性対照薬に曝露された細胞集団の発現量の80%以下、例えば、陰性対照薬に曝露された細胞集団の発現量の79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、50%、49%、48%、47%、46%、45%、44%、43%、42%、41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下、もしくは0%、または

陰性対照薬に曝露された細胞集団の発現量の少なくとも120%、例えば、陰性対照薬に曝露された細胞集団の発現量の少なくとも121%、122%、123%、124%、125%、126%、127%、128%、129%、130%、131%、132%、133%、134%、135%、136%、137%、138%、139%、140%、141%、142%、143%、144%、145%、146%、147%、148%、149%、150%、151%、152%、153%、154%、155%、156%、157%、158%、159%、160%、161%、162%、163%、164%、165%、166%、167%、168%、169%、170%、171%、172%、173%、174%、175%、176%、177%、178%、179%、180%、181%、182%、183%、184%、185%、186%、187%、188%、189%、190%、191%、192%、193%、194%、195%、196%、197%、198%、199%、200%、225%、250%、275%、300%、325%、350%、375%、400%、425%、450%、475%、もしくは少なくとも500%である。

【0033】

「ステップ(b)で測定された1つ以上のタンパク質の対照試料中の存在及び／または量とは異なる」とは、代わりにまたは加えて、試験試料が1つ以上の陰性対照試料とは異なる群に属するものに分類されることを含む。例えば、SVMが使用される場合、試験試料は、1つ以上の陰性対照試料として決定値閾値の反対側にある(例えば、1つ以上の試験物(またはその複製物)が0以下のSVM決定値を有する場合に試験薬が呼吸器感作物質に分類された場合、1つ以上の陽性対照試料(またはそれらの大半)も0以下のSVM決定値を有するべきである)。

【0034】

1つ以上の陰性対照薬は、1-ブタノール、2-アミノフェノール、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ニトロ-1, 4-フェニレンジアミン、4-アミノ安息香酸、クロロベンゼン、ジメチルホルムアミド、エチルバニリン、ホルムアルデヒド、グラニオール、ヘキシルシンナムアルデヒド、イソプロパノール、カトンCG※、サリチル酸メチル

、ペニシリンG、プロピレングリコール、二クロム酸カリウム、過マンガン酸カリウム、Tween 80、及び硫酸亜鉛（すなわち、表1に定義される呼吸器非感作物質の群）からなる群から選択される1つ以上の薬剤を含み得るか、またはそれからなり得る。1つ以上の陰性対照薬は、表1に定義される陰性対照薬の群から選択される1つ以上の薬剤を含み得るか、またはそれからなり得る。

【0035】

陰性対照薬は、本発明の試験薬または対照薬とともに使用するための溶媒であり得る。したがって、陰性対照は、DMSO及び／または蒸留水であり得る。

【0036】

本方法は、少なくとも2つの陰性対照薬（すなわち、非感作薬）、例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または少なくとも100個の陰性対照薬の使用を含み得るか、またはそれからなり得る。

【0037】

あるいはまたは加えて、試験薬への曝露前の樹状細胞または樹状様細胞のステップ（b）で測定された1つ以上のバイオマーカーの発現量は、陰性対照として使用される。

【0038】

さらなる実施形態は、

e）樹状細胞または樹状様細胞の別個の集団を、哺乳動物において吸器感作物質である1つ以上の陽性対照薬に曝露するステップと、

f）それらの細胞において、ステップ（b）で測定された1つ以上のバイオマーカーの発現量を測定するステップと、を含み、
ステップ（f）で測定された1つ以上のバイオマーカーの試験試料中の存在及び／または量が、ステップ（b）で測定された1つ以上のバイオマーカーの1つ以上の陽性対照試料中の存在及び／または量に相当する場合に、試験薬が呼吸器感作物質と特定される。

【0039】

「1つ以上の陽性対照試料における発現量に相当する」とは、試験薬に曝露された細胞集団における1つ以上のバイオマーカーの発現量が、もう1つの陽性対照薬に曝露された細胞集団における発現量と同一であるか、またはそれとは著しく異ならないことを意味する。好ましくは、試験薬に曝露された細胞集団における1つ以上のバイオマーカーの発現量は、もう1つの陽性対照薬に曝露された細胞集団における発現量の81%～119%であり、例えば、もう1つの陽性対照薬に曝露された細胞集団における発現量の82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%以上であり、もう1つの陽性対照薬に曝露された細胞集団における発現量の101%、102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%、110%、111%、112%、113%、114%、115%、116%、117%、118%、または119%以下である。

【0040】

「1つ以上の陽性対照試料における発現量に相当する」とは、代わりにまたは加えて、試験試料が1つ以上の陽性対照試料と同じ群に属するものに分類されることを含む。例えば、SVMが使用される場合、試験試料は、1つ以上の陽性対照試料として決定値閾値の反対側にある（例えば、試験薬が呼吸器感作物質に分類された場合に、1つ以上の試験物（またはその複製物）が0を超えるSVM決定値を有する場合、1つ以上の陽性対照試料

(またはその大半)も0を超えるSVM決定値を有するはずである)。

【0041】

1つ以上の陽性対照薬は、ヘキサクロロ白金酸アンモニウム、過硫酸アンモニウム、エチレンジアミン、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、無水マレイン酸、メチレンジフェノールジイソシアネート、無水フタル酸、トルエンジイソシアネート、及び無水トリメリット酸(すなわち、表1に定義される呼吸器感作物質の群)からなる群から選択される1つ以上の薬剤を含み得るか、またはそれからなり得る。1つ以上の陽性対照薬は、表1に定義される陽性対照薬の群から選択される1つ以上の薬剤を含み得るか、またはそれからなり得る。

【0042】

本方法は、少なくとも2つの陽性対照(すなわち、感作薬)、例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または少なくとも100個の陽性対照薬の使用を含み得るか、またはそれからなり得る。

【0043】

本発明の第1の態様による方法は、TNFRSF19の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよい。本方法は、SNORA74Aの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよい。本方法は、SPAM1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよい。

【0044】

本方法は、Ensembl転写物識別番号(ETID):ENST00000364621の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、HOMER3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、CD1Cの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、IGHD///IGHMの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、SNRPN///SNORD116-26の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000364678の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、STRAPの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、DIABLOの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000411349の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000385497の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、OR51A2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、MRPL21の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PPP1R14Aの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、DEFB127の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C9orf130の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PRO2012の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、LOC399898の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000387701の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、WDR68の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、NEU2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000386677の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、SPARCの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000390342の発現量を測定することを含んでも含まなくても

よく、本方法は、C R N Nの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、M M P 1 2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、A C V R L 1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E I F 4 E 2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、

【0045】

本方法は、R P 1 1－1 9 1 L 9. 1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、P D C D 6／／／A H R Rの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、A R R D C 3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、V W D Eの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、Z B T B 3 4の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、I T G B 1 B P 2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、O R 1 0 K 2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、F L J 2 2 5 9 6の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D：E N S T 0 0 0 0 0 3 0 6 5 1 5の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、A C V R 2 Aの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D：E N S T 0 0 0 0 0 3 8 5 6 9 0の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D：E N S T 0 0 0 0 0 3 8 6 0 1 8の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C 6 o r f 2 0 1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D：E N S T 0 0 0 0 0 3 8 5 5 8 3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D：E N S T 0 0 0 0 0 3 8 5 7 1 9の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、G P R 2 0の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D：E N S T 0 0 0 0 0 3 6 4 3 5 7の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、Z C C H C 1 3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、G P R 6 4の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C D 1 Dの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、D U S P 1 2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、K L H L 3 3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、P S M B 6の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、T M E M 9 5の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C 1 Q B Pの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E M I L I N 2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C D 8 Aの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C 2 0 o r f 1 5 2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、K C N J 4の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D：E N S T 0 0 0 0 0 3 6 4 1 6 3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、F A M 1 9 A 1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D：E N S T 0 0 0 0 0 3 8 4 6 0 1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、P O L R 2 Hの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、A K 0 0 0 4 2 0の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D：E N S T 0 0 0 0 0 3 6 3 3 5 4の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、

【0046】

本方法は、A f f y m e t r i xプローブセット識別番号（A P I D）：8 1 2 1 4 8 3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E G F L 6の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、P O U 3 F 4の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D：E N S T 0 0 0 0 0 3 8 5 8 4 1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、O R 5 2 A 5の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、T I M M 8 Bの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、P E B P 1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、O R 4 F 6の発現量を測定することを含んでも含

10

20

30

40

50

まなくともよく、本方法は、C D H 1 5 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、T M E M 1 9 9 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、A B I 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、F L J 4 2 8 4 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、M C 4 R の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 4 1 0 6 7 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、I S M 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、L O C 4 4 0 9 5 7 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、K L B の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、G M 2 A の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、A N X A 6 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、T A S 2 R 4 0 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、A P I D : 8 1 4 2 8 8 0 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、R A R R E S 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、S H 2 D 4 A の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、P L P 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、A T P 1 A 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 8 6 8 0 0 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、M A T 1 A の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、T S G A 1 0 I P の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、P R D M 7 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 9 0 8 4 7 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 2 5 5 1 8 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、M R P L 3 9 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 8 6 3 2 7 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、T I P A R P の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、

【0047】

本方法は、H E S 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 6 3 5 0 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、P R D M 9 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 9 0 9 1 7 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、K I A A 1 6 8 8 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 9 1 2 1 9 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 8 7 9 7 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、L O C 1 0 0 1 2 9 5 3 4 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、S L C 2 A 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、A F 1 1 6 7 1 4 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E P S 8 L 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、M G C 3 1 9 6 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、7 9 5 2 7 3 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 8 4 3 9 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E M E 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、N E T O 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、N P H S 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 8 4 1 0 9 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 6 4 1 4 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、I S X の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、I L 1 7 R B の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、P C O L C E 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、L R I T 3 の発現量を測定することを含んでも含

10

20

30

40

50

まなくともよく、本方法は、ETID:ENST00000330110の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ZNF354Cの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:ENST00000386444の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、OR2G3の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、GLULの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、CCKBRの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、OR1S2の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、DCUN1D5の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:ENST00000388291の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、EMG1の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、PTHLHの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、

10

【0048】

PTGES3の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、CIDEBの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:ENST00000383863の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ATP10Aの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、MYO5Cの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:ENST00000380078の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、PLA2G10の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、HSPE1の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:ENST00000388324の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、MYO6の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、C7orf30の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:ENST00000340779の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、LOC441245の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、CRIM2の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、XKR4の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、FAM110Bの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、PEBP4の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、LOC644714の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、PAPPASの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、BEX4の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、HMG B4の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:BC028413//BC128516の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:ENST00000363919の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:ENST00000335621の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、SOX1の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、CTS Gの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:ENST00000362344の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、FLJ37464の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、RAXの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、IL29の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、CEACAM20の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、ETID:ETID:ENST00000365557の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、SEC14L3の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、C3orf52の発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、FETUBの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、

20

30

40

【0049】

本方法は、PIGYの発現量を測定することを含んでも含まなくともよく、本方法は、C

50

D H 1 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、L G S N の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 9 1 0 3 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、H G C 6 . 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、t c a g 7 . 8 7 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、T 1 5 6 0 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E X O S C 4 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、T R A M 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、A P I D : 8 1 5 9 3 7 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、O R 1 3 C 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、P L S 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、T M E M 5 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C D 1 B の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、S O R C S 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、O R 5 2 E 8 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、F A M 1 6 0 A 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、L O C 6 4 9 9 4 6 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、F A M 1 5 8 A の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、A P I D : 7 9 8 6 6 3 7 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、M Y O 1 E の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、N U P R 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、A P I D : 8 0 0 5 4 3 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、S I G L E C 1 5 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、2 - M a r の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、L O C 1 0 0 1 3 1 5 5 4 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、G G T L C 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、P S M A 7 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、S L C 2 5 A 1 8 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C 3 o r f 1 4 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C D X 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 8 6 4 3 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、R R A G D の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、S D K 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、L O C 1 6 8 4 7 4 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 8 4 1 2 5 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、T R H R の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、

【0050】

本方法は、I L 1 1 R A の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、M G C 2 1 8 8 1 / / / L O C 5 5 4 2 4 9 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、Z N F 4 8 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C 9 o r f 1 6 9 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、M G C 2 1 8 8 1 / / / L O C 5 5 4 2 4 9 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 6 4 5 0 7 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 8 7 0 0 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 8 8 0 8 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 6 5 0 8 4 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、F R G 2 / / / F R G 2 B / / / F R G 2 C の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C 1 4 o r f 5 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、O D F 3 L 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、F A M 1 8 A の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、P R T N 3 の発現量を測定することを含んでも含まなく

10

20

30

40

50

てもよく、本方法は、CFDの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、TMED1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000387150の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、HSD17B14の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、BOKの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000365609の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、SNRPBの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、EPHA6の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、SCARNA22の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、FLJ35424の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000387555の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000388664の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000363365の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000362861の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000363181の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、GRM6の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、LOC646093の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、HIST1H1Eの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、TIAM2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、

10

20

【0051】

本方法は、ETID:ENST00000363074の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000385777の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、MTUS1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、MUC21の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、WDR8の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、LOC100131195の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、OR4D10の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C12orf63の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ELA1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、DNAJC14///CIP29の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、FLJ40176の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000410207の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PSME3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000405656の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、HN1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000335523の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、CYP2A7///CYP2A7P1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ATXN10の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ZMAT5の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000362493の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、FHITの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、FRG2///FRG2B///FRG2Cの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、SNX18の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000362433の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、DTX2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ASB4の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000365242の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000364204の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、

30

40

50

本方法は、COL5A1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、LCAPの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、APOOの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PTPRUの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、IL28RAの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、NEUROG3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、VAX1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、

【0052】

本方法は、LOC440131の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C13orf31の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ADAMTS7の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、SMTNL2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、LOC284112の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETV2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、FUT2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C2orf39の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、LOC200383//DNAH6の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000385676の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、CCDC108の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、APID:8065011の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C22orf27の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000364444の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PDLIM3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000330110の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000384539の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000390214の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、MGC72080の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C9orf128の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、RGAG4の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PIP5K1Aの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、GPR161の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000385353の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、OR56A3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、OR5A2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、WNT11の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、APID:7960259の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、RAB37の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、LAIR1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000388385の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、CHAC2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000387574の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、

【0053】

本方法は、ETID:ENST00000387884の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、BCL2L1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、KDELR3の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、TMEM108の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、SPATA16の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、BTCの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、SUPT3Hの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、EIF4Bの発現量を

10

20

30

40

50

測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、CHMP4Cの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、H2BFMの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、APID:8180392の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、NR5A2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、TRIM49の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、MS4A6Aの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C11orf10の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、HSPC152の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、RASAL1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000387531の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PLDNの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PER1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ALS2CR12の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C20orf142の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000386848の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、LOC100129113の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、CERKの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000385783の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PROS1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PCDHGAの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、MUC3B///MUC3Aの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000365355の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、APID:8156969の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000358047の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、FAM47Cの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、NXF4の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PIWIL4の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000384727の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ALDH6A1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、TMEM64の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000364816の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよい。

【0054】

本方法は、C11orf73の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、OR5B21の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、NOX5///SPESP1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、AMICA1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000387422の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、SERPINB1の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000387396の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、CD1Aの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、RAB9Aの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C10orf90の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、LPXNの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、GGTLC2の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000384680の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、PNPLA4の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、CAMK1Dの発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、ETID:ENST00000410754の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、CDC123の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法

10

20

30

40

50

は、W D F Y 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、h C G
 _ 1 7 4 9 0 0 5 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C D
 4 8 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、M E D 1 9 の発現
 量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、D R D 5 の発現量を測定す
 ることを含んでも含まなくてもよく、本方法は、A P I D : 7 9 6 7 5 8 6 の発現量を測定
 することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、V A P A の発現量を測定することを含
 んでも含まなくてもよく、本方法は、F A M 7 1 F 1 の発現量を測定することを含んでも
 含まなくてもよく、本方法は、A P I D : 8 1 4 1 4 2 1 の発現量を測定することを含ん
 でも含まなくてもよく、本方法は、H C C S の発現量を測定することを含んでも含まなく
 てもよく、本方法は、C N R 2 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本
 方法は、O I T 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、B M
 P 2 K の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、Z N F 3 6 6 の
 発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、S Y T 1 7 の発現量を測
 定することを含んでも含まなくてもよく、本方法は、C A L M 2 の発現量を測定すること
 を含んでも含まなくてもよく、本方法は、X K の発現量を測定することを含んでも含まな
 くてもよく、本方法は、A R T 4 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、
 本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 3 2 4 1 8 の発現量を測定することを含んでも
 含まなくてもよく、本方法は、Z F P 3 6 L 2 の発現量を測定することを含んでも含ま
 なくてもよく、本方法は、G S T A 3 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよ
 く、本方法は、C O L 2 1 A 1 の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよく、本
 方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 3 2 4 1 8 の発現量を測定することを含んでも
 含まなくてもよく、本方法は、F U C A 1 の発現量を測定することを含んでも含まなく
 てもよく、本方法は、E T I D : E N S T 0 0 0 0 0 3 8 6 6 2 8 の発現量を測定すること
 を含んでも含まなくてもよく、本方法は、A Z U 1 の発現量を測定することを含んでも含
 まなくてもよく、本方法は、I L 7 R の発現量を測定することを含んでも含まなくてもよ
 い。

10

20

【0055】

本方法は、ステップ (b) で、表 A (i) に定義される 1 つ以上のバイオマーカー、例
 えば、表 1 A に定義されるバイオマーカーのうちの少なくとも 2 つまたは 3 つの発現量を
 測定することを含み得るか、またはそれからなり得る。したがって、本方法は、T N F R
 S F 1 9 の発現量を測定することを含み得る。本方法は、S N O R A 7 4 A の発現量を測
 定することを含み得る。本方法は、S P A M 1 の発現量を測定することを含み得る。好ま
 しい実施形態では、本方法は、ステップ (b) で、T N F R S F 1 9、S N O R A 7 4 A
 、及び S P A M 1 の発現量を測定することを含むか、またはそれからなる。

30

【0056】

本方法は、代わりにまたは加えて、ステップ (b) での表 A (i i) に定義される 1 つ
 以上のバイオマーカー、例えば、表 A (i i) に定義されるバイオマーカーのうちの 2、
 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18
 、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、
 32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、4
 5、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58
 、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、
 72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、8
 5、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98
 、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、
 109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、
 119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、
 129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、
 139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、
 149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、

40

50

159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、
 169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、
 179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、
 189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、
 199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、
 209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、
 219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、
 229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、
 239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、
 249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、
 259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、
 269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、
 279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、
 289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、
 299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、
 309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、
 319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、
 329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、
 339、340、341、または342個の発現量を測定することを含み得るか、または
 それからなり得る。

10

20

【0057】

本方法は、代わりにまたは加えて、ステップ（b）で表1Cに定義される1つ以上のバイオマーカー、例えば、表A（i i i）に定義されるバイオマーカーのうちの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、または44個の発現量を測定することを含み得るか、またはそれからなり得る。

【0058】

したがって、表A（i）に定義されるバイオマーカーのすべて及び／または表A（i i i）に定義されるバイオマーカーのすべて及び／または表A（i i i）に定義されるバイオマーカーのすべての発現量がステップ（b）で測定され得る。したがって、本方法は、ステップ（b）で表Aに定義されるバイオマーカーのすべてを測定することを含み得るか、またはそれからなり得る。

30

【0059】

好ましい実施形態では、ステップ（b）は、1つ以上のバイオマーカーをコードする核酸分子の発現量を測定することを含むか、またはそれからなる。核酸分子は、cDNA分子またはmRNA分子であり得る。好ましくは、核酸分子は、mRNA分子である。しかしながら、核酸分子は、cDNA分子であってもよい。

【0060】

一実施形態では、ステップ（b）での1つ以上のバイオマーカーの発現は、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素PCR（RT-PCR）、定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）、ナノアレイ、マイクロアレイ、マクロアレイ、オートラジオグラフィ、及びインサイツハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法を使用して行われる。好ましくは、1つ以上のバイオマーカーの発現量は、DNAマイクロアレイを使用して測定される。

40

【0061】

本方法は、1つ以上の結合部分を使用してステップ（b）で1つ以上のバイオマーカーの発現量を測定することを含み得、1つ以上の結合部分は各々、表Aに特定されるバイオマーカーのうちの1つをコードする核酸分子に選択的に結合することができる。

50

【0062】

一実施形態では、1つ以上の結合部分は各々、核酸分子を含むか、またはそれからなる。さらなる実施形態では、1つ以上の結合部分は各々、DNA、RNA、PNA、LNA、GNA、TNA、またはPMOを含むか、またはそれからなる。好ましくは、1つ以上の結合部分は各々、DNAを含むか、またはそれからなる。一実施形態では、1つ以上の結合部分は、5～100ヌクレオチド長である。しかしながら、代替の実施形態では、それらは、15～35ヌクレオチド長である。

【0063】

1つ以上の結合部分は、Human Gene 1.0 STアレイ (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) の1つ以上のプローブを含み得るか、またはそれからなり得る。プローブ識別番号は、本明細書の表Aに提供される。

10

【0064】

好適な結合剤（結合分子とも称される）は、以下で論じられるように、所与の核酸、タンパク質、またはアミノ酸モチーフに結合するそれらの能力に基づいて、あるライブラリから選択またはスクリーニングされ得る。

【0065】

好ましい実施形態では、結合部分は、検出可能な部分を含む。

【0066】

「検出可能な部分」とは、その存在ならびに／または相対量及び／もしくは位置（例えば、アレイ上の位置）の直接または間接的な決定を許可する部分を含む。

20

【0067】

好適な検出可能な部分は、当該技術分野で周知である。

【0068】

例えば、検出可能な部分は、特定の条件に曝露されたときに検出され得る蛍光及び／または発光及び／または化学発光部分であり得る。かかる蛍光部分は、蛍光部分の励起を引き起こすために特定の波長及び強度で放射線（すなわち、光）に曝露されなければならない、それにより、その蛍光部分が検出され得る特定の波長で検出可能な蛍光を放出することができるようになり得る。

【0069】

あるいは、検出可能な部分は、（好ましくは検出不能な）基質を、可視化及び／または検出され得る検出可能な生成物に変換することができる酵素であり得る。好適な酵素の例は、例えば、ELISAアッセイに関して、以下でより詳細に論じられている。

30

【0070】

したがって、検出可能な部分は、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射性部分（例えば、放射性原子）、または酵素部分からなる群から選択され得る。好ましくは、検出可能な部分は、放射性原子を含むか、またはそれからなる。放射性原子は、テクネチウム-99m、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、リン-32、硫黄-35、重水素、三重水素、レニウム-186、レニウム-188、及びイットリウム-90からなる群から選択され得る。

40

【0071】

明らかに、検出される薬剤（例えば、本明細書に記載の試験試料及び／もしくは対照試料中の1つ以上のバイオマーカーならびに／または選択されたタンパク質の検出に使用するための抗体分子等）は、検出可能な部分が容易に検出可能になるように、適切な原子同位体を十分に有するべきである。

【0072】

代替の好ましい実施形態では、結合部分の検出可能な部分は、蛍光部分である。

【0073】

放射性標識または他の標識が、本発明の方法の試料中に存在するバイオマーカー及び／または本発明の結合部分に既知の方法で組み込まれてもよい。例えば、結合剤がポリペプ

50

チドである場合、生合成され得るか、または例えば水素の代わりにフッ素-19を含む好適なアミノ酸前駆体を使用して化学的アミノ酸合成によって合成され得る。 ^{99m}Tc 、 ^{123}I 、 ^{186}Rh 、 ^{188}Rh 、及び ^{111}In 等の標識は、例えば、結合部分のシステイン残基を介して結合され得る。イットリウム-90は、リジン残基を介して結合され得る。IODOGEN法 (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57) を使用して、 ^{123}I を組み込むことができる。参考文献 (“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”, J-F Chatral, CRC Press, 1989) は、他の方法を詳細に説明している。他の検出可能な部分 (酵素、蛍光、発光、化学発光、または放射性部分等) をタンパク質に接合するための方法が、当該技術分野で周知である。

10

【0074】

当業者であれば、試験される試料 (複数可) 中のバイオマーカーが、前記タンパク質の存在、量、及び/または位置の決定を間接的に支援する部分で標識され得ることを理解するであろう。したがって、この部分は、多成分の検出可能な部分の1つの成分を構成し得る。例えば、試験される試料 (複数可) 中のバイオマーカーは、検出可能な標識に融合されるか、またはさもなければ連結されるストレプトアビジンを使用してそれらのその後の検出を可能にするビオチンで標識され得る。

【0075】

本発明の第1の態様に提供される方法は、ステップ (b) で、表Aに定義される1つ以上のバイオマーカーのタンパク質の発現量を決定することを含み得るか、またはそれからなり得る。本方法は、ステップ (b) で1つ以上の結合部分を使用して1つ以上のバイオマーカーの発現量を測定することを含み得、1つ以上の結合部分が各々、表Aに特定されるバイオマーカーのうちの1つに選択的に結合することができる。1つ以上の結合部分は、抗体またはその抗原結合断片、例えば、モノクローナル抗体またはその断片を含み得るか、またはそれからなり得る。

20

【0076】

「抗体」という用語は、任意の合成抗体、組換え抗体、または抗体ハイブリッド (免疫グロブリン軽鎖及び/もしくは重鎖可変及び/もしくは定常領域のファージディスプレイによって産生される一本鎖抗体分子、または当業者に既知の免疫アッセイ形式で抗原に結合することができる他の免疫相互作用分子等であるが、これらに限定されない) を含む。

30

【0077】

我々は、アフィボディ及びアプタマー等の抗体様結合剤の使用も含む。

【0078】

それらの特異的結合部位を保持する抗体断片の合成に関わる技法の一般概説は、Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299で見つかるであろう。

【0079】

加えてまたはあるいは、第1の結合分子のうちの1つ以上は、アプタマーであり得る (Collett et al., 2005, Methods 37: 4-15を参照のこと)。

40

【0080】

分子ライブラリ、例えば、抗体ライブラリ (Clackson et al, 1991, Nature 352, 624-628, Marks et al, 1991, J Mol Biol 222 (3): 581-97)、ペプチドライブラリ (Smith, 1985, Science 228 (4705): 1315-7)、発現cDNAライブラリ (Santi et al (2000) J Mol Biol 296 (2): 497-508)、アフィボディ等の抗体フレームワーク以外の他の足場のライブラリ (Gunneriusson et al, 1999, Appl Environ Microbiol 65 (9): 4134-40)、またはアプタマーベースのライブラリ (Ken

50

an et al, 1999, Methods Mol Biol 118, 217-31) は、所与のモチーフに特異的な結合分子が本発明の方法で使用するために選択される源として使用され得る。

【0081】

これらの分子ライブラリは、原核細胞 (Clackson et al, 1991 (前掲書)、Marks et al, 1991 (前掲書)) もしくは真核細胞 (Kieck et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96 (10) : 5651-6) においてインビボで発現され得るか、または細胞の関与なしにインビトロで発現され得る (Hanes & Pluckthun, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94 (10) : 4937-42、He & Taus sig, 1997, Nucleic Acids Res 25 (24) : 5132-4、Nemoto et al, 1997, FEBS Lett, 414 (2) : 405-8)。

10

【0082】

タンパク質ベースのライブラリが使用される場合、可能性のある結合分子のライブラリをコードする遺伝子は、多くの場合、ウイルス中にパッケージングされ、可能性のある結合分子がウイルスの表面にディスプレイされる (Clackson et al, 1991 (上記参照)、Marks et al, 1991 (上記参照)、Smith, 1985 (上記参照))。

【0083】

恐らく、最も一般に使用されているディスプレイ系は、抗体断片をそれらの表面でディスプレイする繊維状バクテリオファージであり、それらの抗体断片がバクテリオファージの微量の外殻タンパク質への融合物として発現される (Clackson et al, 1991 (上記参照)、Marks et al, 1991 (上記参照))。しかしながら、ディスプレイに好適な他の系は、他のウイルス (欧州特許第 39578 号)、細菌 (Gunneriusson et al, 1999 (上記参照)、Daugherty et al, 1998, Protein Eng 11 (9) : 825-32、Daugherty et al, 1999, Protein Eng 12 (7) : 613-21)、及び酵母 (Shusta et al, 1999, J Mol Biol 292 (5) : 949-56) の使用を含む。

20

30

【0084】

加えて、ディスプレイ系は、いわゆるリボソームディスプレイ系におけるポリペプチド生成物のそのコード mRNA への連結 (Hanes & Pluckthun, 1997 (上記参照)、He & Taus sig, 1997 (上記参照)、Nemoto et al, 1997 (上記参照))、またはあるいはポリペプチド生成物のコード DNA への連結 (米国特許第 5,856,090 号及び国際公開第 WO98/37186 号を参照のこと) を利用して開発されている。

【0085】

抗体の可変重鎖 (V_H) ドメイン及び可変軽鎖 (V_L) ドメインは、抗原認識に関与しており、このことは、初期のプロテアーゼ消化実験によって最初に認識された。齧歯類抗体の「ヒト化」によりさらに確信された。齧歯類起源の可変ドメインがヒト起源の定常ドメインに融合されて、結果として生じる抗体が齧歯類親抗体の抗原特異性を保持するようになる (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855)。

40

【0086】

その抗原特異性は、可変ドメインによって付与され、定常ドメインとは無関係であり、抗体断片の細菌発現を伴う実験から知られており、これらの抗体断片はすべて 1 つ以上の可変ドメインを含む。これらの分子としては、Fab 様分子 (Better et al (1988) Science 240, 1041)、Fv 分子 (Skerra et al (1988) Science 240, 1038)、 V_H パートナードメインと V_L パ

50

ートナードメインが可動性オリゴペプチドを介して連結されている一本鎖Fv (ScFv) 分子 (Bird et al (1988) Science 242, 423、Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85、5879)、及び単離されたVドメインを含む単一ドメイン抗体 (dAb) (Ward et al (1989) Nature 341, 544)。それらの特異的結合部位を保持する抗体断片の合成に関わる技法の一般概説は、Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299で見つかるであろう。

【0087】

抗体または抗原結合断片は、インタクトな抗体、Fv断片 (例えば、一本鎖Fv及びスルフィド結合Fv)、Fab断片 (例えば、Fab断片、Fab'断片、及びF(ab)₂断片)、単一可変ドメイン (例えば、V_Hドメイン及びV_Lドメイン)、ならびにドメイン抗体 (dAb、単一形式及び二重形式 [すなわち、dAb-リンカー-dAb] を含む) からなる群から選択され得る。好ましくは、抗体または抗原結合断片は、一本鎖Fv (scFv) である。

【0088】

あるいは、1つ以上の結合部分は、抗体様結合剤、例えば、アフィボディまたはアプタマーを含み得るか、またはそれからなり得る。

【0089】

「scFv分子」とは、V_HパートナードメインとV_Lパートナードメインが可動性オリゴペプチドを介して連結されている分子を意味する。

【0090】

全抗体ではなく抗体断片を使用する利点は、いくつもある。より小さい断片が、改善された薬理学的特性、例えば、より良好な固形組織透過性につながり得る。補体結合等の全抗体のエフェクター機能が除去される。Fab、Fv、ScFv、及びdAb抗体断片はすべて、大腸菌で発現され、かつそれから分泌されるため、大量の前記断片の容易な産生が可能になり得る。

【0091】

全抗体及びF(ab')₂断片は、「二価」である。「二価」とは、前記抗体及びF(ab')₂断片が2つの抗原結合部位を有することを意味する。対照的に、Fab、Fv、ScFv、及びdAb断片は、抗原結合部位を1つのみ有する一価である。

【0092】

これらの抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。好適なモノクローナル抗体は、既知の技法、例えば、“Monoclonal Antibodies: A manual of techniques”, H Zola (CRC Press, 1988) 及び“Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and applications”, J G R Hurrell (CRC Press, 1982) に開示される技法によって調製することができ、これらはいずれも参照により本明細書に組み込まれる。

【0093】

可能性のある結合分子がライブラリから選択されると、定義されたモチーフを有する1つ以上のセクターペプチドが通常用いられる。ペプチド中での可動性を低減する構造を提供するアミノ酸残基、または結合分子との相互作用を可能にする荷電、極性、もしくは疎水性側鎖が、セクターペプチドのモチーフ設計に使用され得る。例えば、

(i) プロリンは、その側鎖がアルファ炭素にも窒素にも結合されるため、ペプチド構造を安定させ得る。

(ii) フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンが芳香族側鎖を有し、高度に疎水性である一方で、ロイシン及びイソロイシンは、脂肪族側鎖を有し、同様に疎水性である。

(iii) リジン、アルギニン、及びヒスチジンが塩基性側鎖を有し、中性pHで正に帯電される一方で、アスパラギン酸塩及びグルタミン酸塩は、酸性側鎖を有し、中性pHで

10

20

30

40

50

負に帯電される。

(i v) アスパラギン及びグルタミンは、中性pHで中性であるが、水素結合に関与し得るアミド基を含有する。

(v) セリン、トレオニン、及びチロシン側鎖は、水素結合に関与し得るヒドロキシル基を含有する。

【0094】

典型的には、結合分子の選択は、結合分子の種類に対応するスポットへの結合を分析するためのアレイ技術及びシステムの使用を必要とし得る。

【0095】

1つ以上のタンパク質結合部分は、検出可能な部分を含み得る。検出可能な部分は、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射性部分、及び酵素部分からなる群から選択され得る。

10

【0096】

本発明の方法のさらなる実施形態では、ステップ(b)は、1つ以上のタンパク質に結合することができる第2の結合剤を含むアッセイを使用して行うことができ、第2の結合剤は、検出可能な部分も含む。好適な第2の結合剤は、第1の結合剤に関して上で詳述されている。

【0097】

したがって、試験される試料中の目的とするタンパク質は、第1の結合剤を使用して最初に単離及び／または固定化され得、その後、前記バイオマーカーの存在及び／または相対量が第2の結合剤を使用して決定され得る。

20

【0098】

一実施形態では、第2の結合剤は、抗体またはその抗原結合断片、典型的には、組換え抗体またはその断片である。好都合に、抗体またはその断片は、免疫グロブリン分子のscFv、Fab、結合ドメインからなる群から選択される。好適な抗体及び断片、ならびにそれらを作製するための方法は、上で詳述されている。

【0099】

あるいは、第2の結合剤は、アフィボディまたはアプタマー等の抗体様結合剤であり得る。

【0100】

あるいは、試験される試料中のタンパク質の検出可能な部分は、特異的結合対のあるメンバー（例えば、ビオチン）を含むか、またはそれからなる場合、第2の結合剤は、特異的結合対の称赞メンバー（例えば、ストレプトアビジン）を含み得るか、またはそれからなり得る。

30

【0101】

検出アッセイが使用される場合、検出可能な部分が、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射性部分、酵素部分からなる群から選択されることが好ましい。本発明の方法での使用に好適な検出可能な部分の例は、上述されている。

【0102】

血清または血漿タンパク質を検出するための好ましいアッセイとしては、酵素結合免疫吸着剤アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、免疫放射定量アッセイ(IRMA)、ならびに免疫酵素アッセイ(HEMA)、例えば、モノクローナル抗体及び／またはポリクローナル抗体を使用したサンドイッチアッセイが挙げられる。例示のサンドイッチアッセイは、参照により本明細書に組み込まれるDavidらにより米国特許第4,376,110号及び同第4,486,530号に説明されている。スライド上での細胞の抗体染色は、細胞学研究室診断試験において知られており、当業者にも知られている方法で使用され得る。

40

【0103】

したがって、一実施形態では、このアッセイは、通常固相アッセイにおいて着色された反応生成物をもたらす酵素の使用を典型的に必要とするELISA(酵素結合免疫吸着剤

50

アッセイ)である。西洋ワサビペルオキシダーゼ及びホスファターゼ等の酵素が広く用いられている。ホスファターゼ反応の増幅法は、基質としてNADPを使用してNADを生成することであり、これは、第2の酵素系の補酵素としての役割を果たすようになる。大腸菌由来のピロホスファターゼは、この酵素が組織中に存在せず、安定しており、かつ良好な反応色をもたらすため、良好な接合体を提供する。ルシフェラーゼ等の酵素に基づく化学発光系も使用することができる。

【0104】

ビタミンであるビオチンとの接合が頻繁に使用されており、ビオチンとの接合が、それが高度の特異性及び親和性で結合する酵素結合アビジンまたはストレプトアビジンとのその反応によって容易に検出され得るためである。

10

【0105】

代替の実施形態では、タンパク質検出に使用されるアッセイは、好都合に、蛍光定量アッセイである。したがって、第2の結合剤の検出可能な部分は、Alexaフルオロフォア(例えば、Alexa-647)等の蛍光部分であり得る。

【0106】

好ましくは、ステップ(b)、(d)、及び/または(f)は、アレイを使用して行われる。アレイは、ビーズベースのアレイまたは表面ベースのアレイであり得る。アレイは、マクロアレイ、マイクロアレイ、ナノアレイからなる群から選択され得る。

【0107】

一実施形態では、本方法は、呼吸器過敏性応答を誘導することができる薬剤を特定するためのものである。好ましくは、過敏性応答は、体液性過敏性応答、例えば、I型過敏性応答である。好ましくは、本方法は、呼吸器アレルギーを誘導することができる薬剤を特定するためのものである。

20

【0108】

一実施形態では、樹状細胞集団または樹状様細胞集団は、樹状細胞集団である。好ましくは、樹状細胞は、初代樹状細胞である。好ましくは、樹状細胞は、骨髓樹状細胞である。

【0109】

樹状細胞集団または樹状様細胞は、好ましくは、哺乳類起源のものである。好ましくは、哺乳動物は、ラット、マウス、モルモット、ネコ、イヌ、ウマ、または霊長類である。最も好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

30

【0110】

一実施形態では、樹状細胞集団または樹状様細胞集団は、樹状様細胞集団、好ましくは、骨髓樹状様細胞集団である。

【0111】

一実施形態では、樹状様細胞は、CD54、CD86、CD80、HLA-DR、CD14、CD34、及びCD1aからなる群から選択されるマーカーのうちの少なくとも1つ、例えば、それらのマーカーのうちの2、3、4、5、6、または7つを発現する。さらなる実施形態では、樹状様細胞は、マーカーCD54、CD86、CD80、HLA-DR、CD14、CD34、及びCD1aを発現する。

40

【0112】

さらなる実施形態では、樹状様細胞は、骨髓樹状細胞に由来し得る。好ましくは、樹状様細胞は、骨髓性白血病由来の細胞である。好ましくは、骨髓性白血病由来の細胞は、KG-1、THP-1、U-937、HL-60、Monomac-6、AML-193、単球由来の樹状細胞(MoDC)、及びMUTZ-3からなる群から選択される。最も好ましくは、樹状様細胞は、MUTZ-3細胞である。MUTZ-3細胞は、預入番号ACC295で1995年5月15日よりDeutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ), Inhoffenstraße 7B, Braunschweig, Germany(www.dsmz.de)から入手可能なヒト急性骨髓単球性白血病細胞である。

50

【0113】

一実施形態では、樹状様細胞は、サイトカインでの刺激後、CD1d、MHCクラスI及びIIにより抗原を提示し、かつ／または特異的T細胞増殖を誘導する。

【0114】

したがって、一実施形態では、本方法は、試験薬が呼吸器感作薬であるか否かを示す。代替のまたはさらなる実施形態では、本方法は、試験される試料の呼吸器感作効力を示す。

【0115】

したがって、一実施形態では、本方法は、試験薬の感作物質効力（すなわち、試験薬が、非感作物質、弱い感作物質、中程度の感作物質、強い感作物質、または極度の感作物質のいずれかであることを）を示す。PCAにおける決定値及び距離は、感作物質効力と関連する。

【0116】

あるいはまたは加えて、試験薬効力は、ステップ（e）で、

（i）1つ以上の極度の呼吸器感作物質陽性対照薬、

（ii）1つ以上の強い呼吸器感作物質陽性対照薬、

（iii）1つ以上の中程度の呼吸器感作物質陽性対照薬、及び／または

（iv）1つ以上の弱い呼吸器感作物質陽性対照薬を提供することによって決定することができ、

ステップ（b）で測定された1つ以上のバイオマーカーの試験試料中の存在及び／もしくは量が、ステップ（f）で測定された1つ以上のバイオマーカーの極度の陽性対照試料（存在する場合）中の存在及び／もしくは量に相当する場合に、かつ／またはステップ（f）で測定された1つ以上のバイオマーカーの強い、中程度の、弱い、及び／もしくは陰性対照試料（存在する場合）中の存在及び／もしくは量とは異なる場合に、試験薬が極度の呼吸器感作物質と特定され、

ステップ（b）で測定された1つ以上のバイオマーカーの試験試料中の存在及び／もしくは量が、ステップ（f）で測定された1つ以上のバイオマーカーの強い陽性対照試料（存在する場合）中の存在及び／もしくは量に相当する場合に、かつ／またはステップ（f）で測定された1つ以上のバイオマーカーの極度の、中程度の、弱い、及び／もしくは陰性対照試料（存在する場合）中の存在及び／もしくは量とは異なる場合に、試験薬が強い呼吸器感作物質と特定され、

ステップ（b）で測定された1つ以上のバイオマーカーの試験試料中の存在及び／もしくは量が、ステップ（f）で測定された1つ以上のバイオマーカーの中程度の陽性対照試料（存在する場合）中の存在及び／もしくは量に相当する場合に、かつ／またはステップ（f）で測定された1つ以上のバイオマーカーの極度の、強い、弱い、及び／もしくは陰性対照試料（存在する場合）中の存在及び／もしくは量とは異なる場合に、試験薬が中程度の呼吸器感作物質と特定され、

ステップ（b）で測定された1つ以上のバイオマーカーの試験試料中の存在及び／もしくは量が、ステップ（f）で測定された1つ以上のバイオマーカーの弱い陽性対照試料（存在する場合）中の存在及び／もしくは量に相当する場合に、かつ／またはステップ（f）で測定された1つ以上のバイオマーカーの極度の、強い、中程度の、及び／もしくは陰性対照試料（存在する場合）中の存在及び／もしくは量とは異なる場合に、試験薬が弱い呼吸器感作物質と特定される。

【0117】

したがって、ステップ（e）は、以下の呼吸器感作物質陽性対照カテゴリーを提供することを含み得るか、またはそれからなり得る。

（a）極度、強い、中程度、及び弱い

（b）強い、中程度、及び弱い

（c）極度、中程度、及び弱い

（d）極度、強い、及び中程度

- (e) 極度及び強い
- (f) 強い及び中程度
- (g) 中程度及び弱い
- (h) 強い及び弱い
- (i) 極度及び中程度
- (j) 極度及び弱い
- (k) 極度
- (l) 強い
- (m) 中程度
- (n) 弱い

10

【0118】

陰性対照及び陽性対照は、ヒトにおける臨床的観察に基づいて、それぞれ、呼吸器非感作物質または呼吸器感作物質に分類され得る。

【0119】

あるいはまたは加えて、本方法は、ステップ(b)で測定された1つ以上のバイオマーカの発現量を、ステップ(c)及び／またはステップ(e)で測定された1つ以上のバイオマーカの発現量を表す1つ以上の所定の基準値と比較することを含み得る。

【0120】

概して、呼吸器感作薬は、少なくとも0.55のROC AUC、例えば、少なくとも0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99のROC AUC、または1.00のROC AUCで決定される。好ましくは、皮膚感作薬は、少なくとも0.85のROC AUC、最も好ましくは、1のROC AUCで決定される。

20

【0121】

典型的には、呼吸器感作を誘導することができる薬剤は、<http://cran.r-project.org/web/packages/el071/index.html>から入手可能なもの(例えば、el071 1.5-24)等のサポートベクターマシン(SVM)を使用して特定される。しかしながら、任意の他の好適な手段も使用することができる。SVMを使用して、本明細書に定義される表1の1つ以上のバイオマーカを含むか、またはそれからなるバイオマーカシグネチャーのROC AUCを決定することもできる。

30

【0122】

サポートベクターマシン(SVM)は、分類及び回帰に使用される一組の関連教師あり学習法である。各々が2つのカテゴリーのうちの1つに属するとマークされている一組の訓練例を考慮して、SVM訓練アルゴリズムは、新たな例が一方のカテゴリーまたは他方のカテゴリーに分類されるかを予測するモデルを構築する。直感的に、SVMモデルは、マッピングされる空間内の点としての例の表示であり、別個のカテゴリーの例が可能な限り広い明らかなギャップによって分けられるようになる。その後、新たな例が同じ空間にマッピングされ、それらがギャップのどちら側に分類されるかに基づいてあるカテゴリーに属すると予測される。

40

【0123】

より形式的には、サポートベクターマシンは、高次元または無限次元空間内に超平面または一組の超平面を構築し、それらは、分類、回帰、または他のタスクに使用され得る。直感的に、良好な分離が、任意のクラスの最短訓練データ点に対して最大距離(いわゆる機能的マージン)を有する超平面によって達成され、これは、一般にマージンが大きいほど、分類子の一般化誤差が少なくなるためである。SVMのさらなる情報については、例えば、Burges, 1998, Data Mining and Knowledge Discovery, 2:121-167を参照されたい。

【0124】

本発明の一実施形態では、SVMは、既知の薬剤(すなわち、既知の感作薬または非感

50

作薬)のバイオマーカープロファイルを使用して本発明の方法を行う前に「訓練される」。かかる訓練試料を走行することにより、SVMは、どのバイオマーカープロファイルが感作を誘導することができる薬剤に関連しているかを学習することができる。訓練過程が完了した時点で、SVMは、試験されたバイオマーカー試料が感作薬または非感作薬由来のものであるか否かを予測することができる。

【0125】

当業者であれば、個々のSVMの決定値を個別に決定することができる。一実施形態では、1つ以上の試験物(またはその複製物)が0を超えるSVM決定値を有する場合、試験薬は呼吸器感作物質に分類される。一実施形態では、1つ以上の試験物(またはその複製物)が0以下のSVM決定値を有する場合、試験薬は呼吸器非感作物質に分類される。

10

【0126】

一実施形態では、本方法は、皮膚感作物質であるかにかかわらず呼吸器感作物質である薬剤を特定するためのものである。一実施形態では、本方法は、呼吸器感作物質であるが、皮膚感作物質ではない薬剤を特定するためのものである。別の実施形態では、本方法は、呼吸器感作物質及び皮膚感作物質である薬剤を特定するためのものである。

【0127】

これにより、試験薬を感作薬または非感作薬に分類することが可能になる。さらに、一実施形態では、既知の効力の感作薬(すなわち、非感作、弱い、中程度の、強い、または極度の感作薬)でSVMを訓練することにより、試験薬の効力も比較して特定することができる。

20

【0128】

しかしながら、この訓練手順は、必要な訓練パラメータでSVMを事前にプログラミングすることにより回避され得る。例えば、感作を誘導することができる薬剤は、表Aに列記されるすべてのバイオマーカーの測定及び/または表Bに列記される発現データに基づいて、表5に詳述されるSVMアルゴリズムを使用して既知のSVMパラメータに従って特定することができる。

【0129】

当業者であれば、適切に選択されたデータ(すなわち、既知の感作薬及び/または非感作薬に曝露された細胞由来のバイオマーカー測定値)でSVMマシンを訓練することにより、表Aに列記されるバイオマーカーの任意の組み合わせに好適なSVMパラメータを決定することができることを理解するであろう。あるいは、表Aのバイオマーカーを使用して、当該技術分野で既知の任意の他の好適な統計的方法に従って呼吸器感作を誘導することができる薬剤を特定することができる。

30

【0130】

あるいは、表Aのデータ及び/または表Bのデータを使用して、当該技術分野で既知の任意の他の好適な統計的方法(例えば、ANOVA、ANCOVA、MANOVA、MANCOVA、多変量回帰分析、主成分分析(PCA)、因子分析、正準相関分析、正準相関分析、冗長分析、対応分析(CA、交互平均化)、多次元尺度構成法、判別分析、線形判別分析(LDA)、クラスタリングシステム、再帰分割、及び人工ニューラルネットワーク)に従って呼吸器感作を誘導することができる薬剤を特定することができる。

40

【0131】

好ましくは、本発明の方法は、少なくとも65%の精度、例えば、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の精度を有する。

【0132】

好ましくは、本発明の方法は、少なくとも65%の感度、例えば、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、8

50

8 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %の感度を有する。

【0133】

好ましくは、本発明の方法は、少なくとも65 %の特異度、例えば、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %の特異性を有する。

【0134】

「精度」とは、方法の正しい結果の割合を意味し、「感度」とは、陽性と正しく分類されたすべての陽性化学物質の割合を意味し、「特異度」とは、陰性と正しく分類されたすべての陰性化学物質の割合を意味する。

【0135】

一実施形態では、本発明の第1の態様の方法は、参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2012/056236号（具体的には、その発明の態様及び実施形態、ならびに特許請求の範囲）に記載の哺乳類皮膚の感作を誘導することができる薬剤を特定するための方法を同時にまたは連続して行うことを含む。好ましくは、哺乳類皮膚の感作を誘導することができる薬剤を特定するための方法は、本発明の第1の態様の方法（すなわち、試験薬に曝露された同じ細胞試料（複数可）における関連マーカーの発現量を測定することにより、試験化合物が皮膚及び／または呼吸器感作物質であるかを決定する方法）と同時に行われる。

【0136】

本発明の第2の態様は、本発明の第1の態様（または任意の実施形態またはそれらの実施形態の組み合わせ）の方法に使用するためのアレイを提供し、このアレイは、上に定義される1つ以上の結合部分を含むか、またはそれからなる。一実施形態では、結合部分は、表A(i)に定義されるバイオマーカーのすべてに（集合的に）結合することができる。さらなる実施形態では、結合部分は、表A(ii)に定義されるバイオマーカーのすべてに（集合的に）結合することができる。なおさらなる実施形態では、結合部分は、表A(iii)に定義されるバイオマーカーのすべてに（集合的に）結合することができる。好ましくは、結合部分は、表Aに定義されるバイオマーカーのすべてに（集合的に）結合することができる。

【0137】

結合部分は、固定化され得る。

【0138】

アレイはそれ自体、当該技術分野で周知である。典型的には、アレイは、離間した（すなわち、分離した）領域（「スポット」）を有する線形または二次元構造で形成されており、これらの領域は各々、固体支持体の表面上に形成された有限エリアを有する。アレイは、ビーズ構造である場合もあり、各ビーズは、分子コードもしくは色コードによって特定され得るか、または連続流において特定され得る。分析は、試料が一連のスポットに通される場合、連続して行われる場合もあり、これらのスポットは各々、そのクラスの分子を溶液から吸着させる。固体支持体は、典型的には、ガラスまたはポリマーであり、最も一般に使用されているポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンである。固体支持体は、管、ビーズ、ディスク、シリコンチップ、マイクロプレート、ポリニフッ化ビニリデン（PVDF）膜、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、他の多孔質膜、非多孔質膜（例えば、特に、プラスチック、ポリマー、パースペクス、シリコン）、複数のポリマーピン、もしくは複数のマイクロタイターウェル、またはタンパク質、ポリヌクレオチド、及び他の好適な分子の固定化に好適であり、かつ／または免疫アッセイの実施に好適な任意の他の表面の形態であり得る。結合プロセスは、当該技術分野で周知であり、一般に、タンパク質分子、ポリヌクレオチド等の固体支持体への架橋共有結合または物理的吸着からなる。あるいは、親和性

タグまたは同様の構築物によるプローブの親和性カップリングが用いられ得る。接触もしくは非接触印刷、マスキング、またはフォトリソグラフィー等の周知の技法を使用することにより、各スポットの位置を規定することができる。概説については、Jenkins, R. E., Pennington, S. R. (2001, Proteomics, 2, 13-29) 及び Lal et al (2002, Drug Discov Today 15; 7 (18 Suppl) : S143-9) を参照されたい。

【0139】

典型的には、アレイは、マイクロアレイである。「マイクロアレイ」とは、別個の領域が少なくとも約 $100/\text{cm}^2$ 、好ましくは少なくとも約 $1000/\text{cm}^2$ の密度を有する領域のアレイという意味を含む。マイクロアレイ中の領域は、典型的な寸法、例えば、約 $10\sim 250\text{ }\mu\text{m}$ の範囲の直径を有し、そのアレイ内の他の領域から約同じ距離だけ離れている。アレイは、代わりに、マクロアレイまたはナノアレイであってもよい。

10

【0140】

好適な（上述の）結合分子が特定及び単離された時点で、当業者は、分子生物学の分野で周知の方法を使用してアレイを製造することができる。

【0141】

好ましくは、アレイは、本発明の第1の態様に記載の方法、及びそこに記載される実施形態のうちの1つ以上と一致する。

【0142】

本発明の第3の態様は、過敏性応答感作薬を特定するために、表A(i)、表A(ii)、及び／または表A(iii)に定義される群から選択される1つ以上の（好ましくは2つ以上の）バイオマーカーの併用を提供する。好ましくは、過敏性応答感作薬を特定するために、表A(i)及び表A(ii)に定義されるバイオマーカーのすべてが集合的に使用される。好ましくは、この使用は、本発明の第1の態様に記載の方法、及びそこに記載される実施形態のうちの1つ以上と一致する。

20

【0143】

本発明の第4の態様は、本発明の第1の態様に定義される1つ以上の（好ましくは、2つ以上の）結合部分の使用を提供する。好ましくは、過敏性応答感作薬を特定するために、表A(i)及び表A(ii)に定義されるバイオマーカーのすべての結合部分が集合的に使用される。好ましくは、この使用は、本発明の第1の態様に記載の方法、及びそこに記載される実施形態のうちの1つ以上と一致する。

30

【0144】

本発明の第5の態様は、本発明の第1の態様に従う方法で使用するための分析キットであって、

A) 本発明の第2の態様に従うアレイ及び／または本発明の第1の態様に定義される1つ以上の結合部分と、

B) 任意に、本発明の第1の態様に従う方法を行うための指示と、を含むか、またはそれからなるキットを提供する。

【0145】

分析キットは、1つ以上の対照薬を含み得る。好ましくは、分析キットは、本発明の第1の態様に定義される1つ以上の陰性対照薬及び／または1つ以上の陽性対照薬とともに上記の特徴を含むか、またはそれからなる。好ましくは、分析キットは、本発明の第1の態様に記載の方法、及びそこに記載される実施形態のうちの1つ以上と一致する。

40

【0146】

本発明の第6の態様は、患者における呼吸器I型過敏性反応（呼吸器喘息等）を治療または予防する方法であって、

(a) 患者が曝露されるか、または曝露されている1つ以上の試験薬を提供するステップと、

(b) 本発明の第1の態様に提供される方法を使用して、ステップ(a)で提供された1つ以上の試験薬が呼吸器感作物質であるかを決定するステップと、

50

(c) 1つ以上の試験薬が呼吸器感作物質と特定された場合、その患者の、呼吸器感作物質と特定された1つ以上の試験薬への曝露を低減または予防し、かつ／または感作症状に適切な治療を提供するステップと、を含む、方法を提供する。

【0147】

好ましくは、患者が曝露されるか、または曝露されている1つ以上の試験薬は、患者が現在少なくとも月に1回、例えば、少なくとも2週間に1回、少なくとも週に1回、または少なくとも1日1回に曝露されている薬剤である。

【0148】

感作症状の治療は、短時間作用型ベータ2-アドレナリン受容体作動薬 (SABA) (サルブタモール等)、抗コリン薬 (臭化イプラトロピウム等)、他のアドレナリン作動薬 (吸入エピネフリン等)、コルチコステロイド (ベクロメタゾン等)、長時間作用型ベータアドレナリン受容体作動薬 (LABA) (サルメテロール及びフォルモテロール等)、ロイコトリエン拮抗薬 (モンテルカスト及びザフィルルカスト等)、ならびに／またはコルチコステロイドに代わる別の好ましくない代替物であるマスト細胞安定剤 (クロモリンナトリウム等) を含み得る。

【0149】

好ましくは、治療方法は、本発明の第1の態様に記載の方法、及びそこに記載される実施形態のうちの1つ以上と一致する。

【0150】

本発明の第7の態様は、本発明の第1の態様の方法を行う、例えば、ステップ (b)、(d)、及び／または (f) の発現データを解釈し、それにより、1つ以上の試験薬が呼吸器感作物質であるかを決定するためのコンピュータプログラムを提供する。コンピュータプログラムは、プログラミングされたSVMであり得る。コンピュータプログラムは、当業者に既知の好適なコンピュータ可読担体に記録され得る。好適なコンピュータ可読担体としては、コンパクトディスク (CD-ROM、DVD、ブルーレイ等)、フロッピーディスク、フラッシュメモリドライブ、ROM、またはハードディスクドライブが挙げられ得る。コンピュータプログラムは、コンピュータプログラムの実行に好適なコンピュータにインストールされ得る。

【0151】

本発明のある特定の態様を具現する好ましい非限定的な例が以下の図を参照してこれから説明される。

【図面の簡単な説明】

【0152】

【図1】化学的刺激後のMUTZ-3細胞のCD86発現。示されるデータは、化学的刺激 (n=3)、4-アミノ安息香酸、DMSO、及び刺激されていない細胞 (n=6)、及び過マンガン酸カリウム、2-アミノフェノール、ヘキシルシンナムアルデヒド、及び2-ヒドロキシエチルアクリレート (n=2) の平均であり、エラーバーは、標準偏差を示す。各刺激をその対応する媒体と比較するスチューデントt検定により統計的有意性を決定し、0.05未満のpを*で示す。

【図2】呼吸器感作の予測のための予測バイオマーカーシグネチャーの確立。(A) 教師なし学習を使用して、データセットの表示を構築した。呼吸器感作物質 (青色、n=29) と呼吸器非感作物質 (緑色、n=74) との間の一方向ANOVA p値フィルタリングによって特定された999個の転写物に基づいてPCAを使用して、この方法を可視化した。(B) p値フィルタリングによって特定されたこれらの999個の転写物を変数減少のためにアルゴリズムへの入力として使用した。610個の転写物を除去した後に、カルバック・ライブラー発散のブレイクポイントを観察した。(C) 残りの389個の転写物をPCAへの入力変数として使用した。図に示されるように、訓練データでの呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質との完全な分離が達成された。

【図3】GARD呼吸器予測シグネチャー (GRPS) を使用した独立した試験化合物の視覚的分類。(A) 非管理下の表示への入力としてGRPSの389個の遺伝子を使用し

10

20

30

40

50

て、バイオマーカーシグネチャー特定のために使用した基準化学物質（ $n = 103$ ）のパネルの3つの第1のPCA成分からPCA空間を構築した。これらの化合物がPCA成分に影響を及ぼすことを許容することなく、試験データセット（ $n = 92$ ）の化学物質の各々をPCA空間にプロットした。（B）呼吸器感作物質（濃青色）または呼吸器非感作物質（濃緑色）のいずれかとして感作特性に従って試験データセット中の試料を着色した。訓練データ及び試験データの両方の第1のPCA成分に沿った呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質との分離を確認することができる。（C）訓練データセットをはっきりと見るように、訓練データセットを取り除いた。

【図4】試験データセットのサポートベクターマシン（SVM）分類。教師ありマシン学習用のSVMを使用してGRPSの予測子性能を検証した。SVMアルゴリズムを訓練データセット（ $n = 103$ ）の化合物に対する経験から誘導的に学習し、その後、それを適用して、試験データセット（ $n = 70$ 、媒体対照を除く）の各個々の試料を予測した。ROC曲線分析により予測性能を評価し、曲線下面積（AUC）が0.97であると推定した。

【図5】独立試験データセット中の呼吸器感作物質の分類及び遺伝子発現。SVMアルゴリズムを訓練データセット（ $n = 103$ ）の試料で再び訓練し、その後、それを適用して、独立試験データセット（ $n = 70$ 、媒体対照を除く）の試料を分類した。独立試験データセット中の各個々の試料のSVM決定値を高いものから順にプロットし、感作能力（呼吸器感作物質＝紫色、呼吸器非感作物質＝濃緑色）に従って着色した。散布プロット内の点線は、呼吸器感作物質（SVM決定値＝0未満）または呼吸器非感作物質（SVM決定値＝0超）に分類するための閾値レベルを表す。GRPS内の転写物の相対発現量をヒートマップに示す。

【実施例】

【0153】

序文

背景：ある特定の低分子量（LMW）化学化合物への曝露の繰り返しにより、皮膚または呼吸管におけるアレルギー反応の発症がもたらされ得る。多くの場合、ある特定のLMW化合物は、皮膚を選択的に感作させ、アレルギー性接触皮膚炎（ACD）または呼吸管を引き起こし、職業性喘息（OA）を引き起こす。アレルギー疾患の発症を制限するために、現在、かかる反応を誘導することができる化学物質を正確に特定する予測アッセイの開発への努力が続けられている。しかしながら、わずかな数の有望な皮膚感作予測方法について説明されているが、現在のところ、化学物質を呼吸器感作物質として正確に分類することができる有効なインビトロまたはインビボ方法は存在しない。

【0154】

結果：最近、我々は、ゲノムバイオマーカーシグネチャーの測定に基づいて皮膚感作化学物質を分類するための新規の試験戦略としてインビトロベースのゲノムアレルギー迅速検出（GARD）アッセイを公開した。我々は、GARDアッセイの適用性ドメインを拡大して、呼吸器非感作物質と比較した呼吸器感作物質の389個の差次的に制御された遺伝子を含む別個のバイオマーカーシグネチャーの特定による呼吸器感作物質の分類も行っている。独立データセットを教師ありマシン学習と併用することにより、我々は、特定されたゲノムバイオマーカーが呼吸器感作物質を正確に分類することができることを示すアッセイを実証した。

【0155】

結論：我々は、呼吸器感作物質を分類するためのゲノムバイオマーカーシグネチャーを特定した。この新たに特定されたバイオマーカーシグネチャーを、皮膚感作物質を分類するための以前に特定された我々のバイオマーカーシグネチャーと組み合わせることにより、我々は、同じ試料で皮膚感作及び呼吸器感作の両方を予測する有力な能力を有する新規のインビトロ試験戦略を開発した。

【0156】

材料及び方法

化学物質

訓練データセットと集合的に名付けた選択された10個の十分に特徴付けられた呼吸器感作物質及び22個の呼吸器非感作物質を含む32個の基準化学物質のパネルを使用して細胞を刺激し、予測ゲノムバイオマーカーシグネチャーを確立した。呼吸器感作物質は、ヘキサクロロ白金酸アンモニウム、過硫酸アンモニウム、エチレンジアミン、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、無水マレイン酸、メチレンジフェニルジイソシアネート、無水フタル酸、トルエンジイソシアネート、及び無水トリメリット酸であった。呼吸器非感作物質は、1-ブタノール、2-アミノフェノール、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ニトロ-1, 4-フェニレンジアミン、4-アミノ安息香酸、クロロベンゼン、ジメチルホルムアミド、エチルバニリン、ホルムアルデヒド、ゲラニオール、ヘキシルシンナムアルデヒド、イソプロパノール、カトンCG、サリチル酸メチル、ペニシリンG、ニクロム酸カリウム、過マンガン酸カリウム、プロピレングリコール、Tween 80、硫酸亜鉛、ならびに媒体対照ジメチルスルホキシド及び水であった。さらに、独立試験データセットと集合的に名付けた6個の呼吸器感作物質及び19個の呼吸器非感作物質を含む25個の化学物質のパネルを使用して細胞を刺激し、特定された予測ゲノムバイオマーカーシグネチャーの検証のための独立試験セットを形成した。独立訓練データセットは、モデルの訓練中に含めた対照化学物質及びモデルの訓練中に見られなかった化学物質の両方から成った。呼吸器感作物質は、クロラミンT、エチレンジアミン、イソホロンジイソシアネート、無水フタル酸、ピペラジン、及び反応性オレンジであった。呼吸器非感作物質は、1-ブタノール、2, 4-ジニトロクロロベンゼン、2-メルカプトベンゾチアゾール、ベンズアルデヒド、クロロベンゼン、シンナミルアルコール、フタル酸ジエチル、オイゲノール、グリセロール、グリオキサール、イソオイゲノール、乳酸、オクタ酸、フェノール、p-ヒドロキシ安息香酸、p-フェニレンジアミン、レゾルシノール、サリチル酸、及びドデシル硫酸ナトリウムであった。すべての化学物質をSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。細胞刺激前に、化学物質をGARD入力濃度になるまで水またはDMSOのいずれか中に溶解し、希釈した。DMSO中に溶解した化学物質の場合、DMSOのウェル内濃度は、0.1%であった。各化学化合物の化学物質細胞毒性及びGARD入力濃度の確立の監視を前述のように[41、42]に行った。手短に言えば、GARD入力濃度を以下の決定スケジュールに従って決定した。非毒性可溶性化合物を500 uMに相当する濃度で使用した。500 uMでは不溶性の非毒性難溶性化合物を最も高い溶解濃度で使用した。毒性化合物を90%の相対生存率(Rv90)をもたらす濃度で使用した。最初に満たされた判断基準により、各化合物のGARD入力濃度が決定された。予測ゲノムバイオマーカーシグネチャーを確立するために使用した化合物のGARD入力濃度、感作効力、及び溶媒を表1に提示し、予測ゲノムバイオマーカーシグネチャーを検証するために使用した化合物については表2に提示する。

【0157】

細胞培養物、表現型分析、化学物質への曝露、細胞回収、及びmRNA単離

ヒト急性骨髄単球性白血病細胞株MUTZ-3 [68、69]をLeibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) から入手した。細胞の維持、MUTZ-3の化学的刺激、ならびにmRNAのその後の単離及びcDNAの調製のすべてを前述のように[41、42]に行った。手短に言えば、化学的刺激前にフローサイトメトリーを使用してMUTZ-3の表現型制御を行い、細胞が未熟な状態であることを確認した。以下のFITC接合マウスモノクローナル抗体(mAb): CD1a (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)、CD34、CD86、HLA-DR、IgG1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)を使用した。以下のPE接合マウスモノクローナル抗体: CD14 (DakoCytomation)、CD54、CD80、IgG1 (BD Biosciences)を使用した。ヨウ化プロピジウ

ム (BD Biosciences) 染色を使用して、細胞生存率を決定した。試料を FACS Canto II 計器に走行させた。FACS Diva ソフトウェア (BD Biosciences) を使用してデータを取得し、FCS 発現 V4 (De Novo Software、Los Angeles, CA) を使用して分析した。前方散乱及び側方散乱特性に基づいてゲーティングを行って、細胞残屑及び生育不能細胞を排除し、アイソタイプ対照を使用して象限を確立した。化学物質への曝露中、細胞を 24 ウェルプレート中に 200,000 細胞/mL で播種し、GARD 入力濃度で化学化合物に曝露した。刺激した細胞を 37℃ 及び 5% CO₂ で 24 時間インキュベートした後に収集し、製造業者 (Life Technologies) により提供された標準化プロトコルを使用して、RNA を TRIzol (登録商標) 試薬 (Life Technologies、Carlsbad, CA) で単離した。並行して、CD86 のフローサイトメトリー分析により、これらの細胞の成熟状態の制御を行った。製造業者 (Affymetrix) により提供された標準化プロトコルに従って、cDNA の調製、ならびに Human Gene 1.0 ST アレイ (Affymetrix、Santa Clara, CA, USA) のハイブリダイゼーション、洗浄、及び走査を行った。

【0158】

マイクロアレイデータ分析及び統計的方法

単一チャンネルアレイ正規化 (SCAN) アルゴリズム [70] を使用して Human Gene 1.0 ST アレイから得られた遺伝子発現データを正規化し、ComBat [71] 経験ベイズ法を使用して異なる組の実験間の潜在的なバッチ効果を調整した。オープンソフトウェア Bioconductor v2.14 [73] を追加のソフトウェアパッケージ SCAN.UPC [70] 及び sva [74] とともに使用して、正規化及びバッチ調整を R 統計ソフトウェア [72] で行った。正規化データを Qlucore Omics Explorer 3.0 (Qlucore AB、Lund, Sweden) に取り込み、主成分分析 (PCA) [75] を使用して可視化した。偽発見率 (FDR) [76] を使用して予測子を一方向 ANOVA p 値フィルタリングから選択して、呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質を比較する多重仮説試験を調整した。変数減少 [41, 52] のラッパアルゴリズムを上位 999 個の予測子に適用して、バイオマーカーシグネチャーサイズをさらに低減及び精緻化した。変数減少アルゴリズムを修正して、受信者動作特性面積 (AUC ROC) [77] を最大化するのではなく、カルバック・ライブラー誤差 [53] を最小限に抑えて、AUC ROC が 1.0 に到達した場合のシグネチャーの最適化を可能にした。変数減少後に選択された上位 389 個の予測子を「GARD 呼吸器予測シグネチャー」と集合的に指名した。変数減少のスクリプトを追加のパッケージ e1071 [78] とともに R にプログラミングした。前述の線形カーネル [41] に基づいて、サポートベクターマシン (SVM) [79] に基づく交差検証を使用して、予測ゲノムバイオマーカーシグネチャーを確立した方法を検証した。手短に言えば、訓練データセットを、刺激の 70% を含む新たな交差検証訓練データセットと刺激の 30% を含む交差検証試験データセットとに無作為に分けた。加えて、完全な訓練データセットにおいて見られるように呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質との間の割合を同じ割合に維持するように注意を払った。上述の一方向 ANOVA p 値フィルタリングを使用して、新たな予測ゲノムバイオマーカーシグネチャーを交差検証訓練データセットから特定した。特定された予測バイオマーカーシグネチャーを使用して、交差検証訓練データセットの情報に基づいて SVM を訓練した。SVM を追加のパッケージ e1071 を用いて R 統計ソフトウェアにコンパイルした。その後、SVM モデルを使用して、交差検証試験データセット中の試料を予測した。バイオマーカー特定プロセスを 20 回繰り返し、各個々の転写物が 20 個の訓練データセットに含まれた頻度 (検証コール頻度 (VCF) と称する) を計算することにより、特徴選択プロセスのロバスト性を評価した。[46] に記載の独立試験データセットを使用して、未知の試料の予測の観点での GRPS の予測性能を推定した。手短に言えば、可変入力として GRPS を使用して、SVM を訓練データセットで訓練した。その後、SVM を使用して、訓練データセット中の試料を上述の交差検証につ

10

20

30

40

50

いて記載した方法と同じ方法で予測し、追加のパッケージ R O C R [8 0] を使用して R 統計環境下で決定された A U C R O C を使用して、モデルの予測性能を評価した。呼吸器感作物質または呼吸器非感作物質としての試料の分類は、複製レベルでの S V M 決定値に基づいた。したがって、ある特定の化学的刺激的複製刺激のうちのいずれかが 0 を超える S V M 決定値を有する場合、化学物質を呼吸器感作物質に分類した。クーパー統計値 [8 1] を使用して、アッセイの精度、感度、及び選択性を決定した。M e t a C o r e (商標) (T h o m s o n R e u t e r s , N e w Y o r k , N Y) を使用して機能エンリッチメントを行うことにより、G R P S の生物学的関連性を探索した。p 値フィルタリングからの上位 9 9 9 個の予測子を M e t a C o r e (商標) アルゴリズムへの入力として使用し、入力分子に関連した標準経路を探索することにより生物学的関連性を確立した。アレイデータは、受入番号 E - M E X P - 3 7 7 3 で A r r a y E x p r e s s (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) にアップロードされている。

10

【 0 1 5 9 】

結果

刺激されていない M U T Z - 3 細胞及び化学的に刺激された M U T Z - 3 細胞の表現型分析

化学物質で刺激する前に、フローサイトメトリーを使用して一般的な骨髄細胞マーカー及び樹状細胞マーカーの細胞発現量を測定することにより、細胞の品質を管理した。これらのマーカーは、C D 1 a 、 C D 1 4 、 C D 3 4 、 C D 5 4 、 C D 8 0 、 C D 8 6 、 及び H L A - D R を含んだ。結果は、以前に公開された表現型プロファイル [4 1] と相関し、細胞の未熟な状態での維持に成功したことを確認した。化学的刺激後、10 個の呼吸器感作物質及び 20 個の呼吸器非感作物質、ならびに媒体対照 (表 1) を含む基準化学物質のパネルを使用して、共刺激マーカー C D 8 6 の細胞表面発現レベルを測定することにより、細胞の一般的な成熟状態を再度検証し、結果を図 1 に提示する。刺激されていない細胞と比較した各刺激に対する C D 8 6 の化学的に誘導された上方制御は、数回の刺激後の細胞において明らかであった。しかしながら、複製刺激間の大きい標準偏差のため、呼吸器感作物質ヘキサクロロ白金酸アンモニウム及びグルタルアルデヒドにより誘導された制御のみが統計的に有意であると確認することができた (スチューデント t 検定、 $p = 0.05$ 未満) 。その結果として、呼吸器感作の分類のための単一のバイオマーカーとして C D 8 6 を使用したアッセイは、20 % の感度しかもたらさなかった。さらに、呼吸器非感作刺激物質 2 - アミノフェノール及びカトン C G において C D 8 6 の上方制御も観察された。したがって、我々は、呼吸器化学感作物質を分類するために C D 8 6 を M U T Z - 3 細胞株で単一のバイオマーカーとして使用することができないと結論付けた。しかしながら、呼吸器感作物質の多くが細胞培地中で難溶性であり、それ故に細胞毒性を誘導するのに十分な濃度で使用することができないため、C D 8 6 の発現は、化学的刺激的生物学的利用能を確実なものにするために相補的品質管理の役割を果たすことができる。

20

30

【 0 1 6 0 】

化学的に刺激された M U T Z - 3 の転写プロファイリングによる予測ゲノムバイオマーカーシグネチャーの特定

40

M U T Z - 3 細胞の化学的に誘導された変化を転写規模で調査して、呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質との間の最も差のある転写物を特定した。基準化学物質のパネルを使用して細胞を 24 時間刺激した後、転写プロファイリングのために m R N A を収集した。刺激は、10 個の異なる呼吸器感作物質、20 個の呼吸器非感作物質 (陰性対照) 、及び媒体対照 (D M S O 、 蒸留水) を含んだ。4 - アミノ安息香酸及び過マンガン酸カリウム以外、すべての刺激を生物学的に三連で行い、4 - アミノ安息香酸は、内部制御のため 6 個の複製物で分析し、過マンガン酸カリウムは、欠陥アレイのため 2 個の複製物のみで分析した。加えて、媒体対照 (D M S O 及び蒸留水) を各々 6 個の複製物で分析した。試料の品質管理により、過硫酸アンモニウムの複製刺激のうちの 1 つが相当な外れ値であることが明らかになり、バイオマーカー発見を妨害しないようにそれを取り除く必要があった。

50

要約すると、分析の準備が整ったデータセットは、103個のアレイからなり、各々、29,141個の転写物の測定値を有した。

【0161】

遺伝子発現データをQlucore Omics Explorerに取り込み、主成分分析（PCA）を使用して可視化した。我々は、データセットのノイズを低減し、かつ内在特性に基づいて予測子を選択するためにフィルタリング方法を組み合わせた特徴選択のための段階的アプローチと、各個々の予測子がどのように全体のシグネチャーと集合的に機能するかを考慮することによりシグネチャー中の遺伝子の数を低減するために変数減少に基づくラッパー方法とを適用した。フィルタリング方法は、呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質を比較する一方向ANOVA分析によって決定されたp値に完全に基づいた。ラッパー方法は、繰り返し教師あり学習に基づいた。変数減少のアルゴリズムを社内で開発し[52]、転写物のサブセットを反復的に抽出し、その後、一個抜き交差検証手順を使用してサポートベクターマシン（SVM）を訓練及び試験することによりこの転写物のサブセットを評価した。最も情報価値の低い変数を取り除き、分類モデルの最も高い性能が達成されるまでこのプロセスを繰り返した。計算的限界のため、およそ1000個の遺伝子が、変数減少のアルゴリズムで入力として使用するのに適切な量の可能性のある予測子である。本データセットにおいて、予測子候補のこの事前選択により、999個の遺伝子がもたらされ、p値は0.024以下であった。図2Aに示されるように、これらの遺伝子は、呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質との間の区分を集合的に達成することができたが、これらの2つの群間にいくらかの重複が生じた。データが 10^{-6} に至るp値を有する予測子候補を含んだにもかかわらず、それらのp値によりもたらされた順位で予測子の数をさらに低減しても、明らかな分離を達成しなかった。その後、社内で開発された変数減少のアルゴリズムを適用し、最も少ない情報しか提供しない予測子（遺伝子）を取り除いた。610個の予測子を除外したあとに、カルバック・ライブラー発散（KLD）[53]における極小値が観察された（図2B）。残りの389個の遺伝子を「GARD呼吸器予測シグネチャー」（GRPS）と集合的に名付け、訓練データセットの呼吸器化学感作物質と呼吸器非感作物質とを区別するそれらの能力を図2Cに示す。これらの遺伝子のアイデンティティーを表Aに列記する。バイオマーカーシグネチャーを確立した方法を検証するために、我々は、交差検証手順を行い、いくつかの方法に記載されるようにバイオマーカー発見中に使用した試料を訓練セットと試験セットとに無作為に分けた。このプロセスを20回繰り返し、20個の新たなバイオマーカーシグネチャーの各予測子転写物の頻度をロバスト性の尺度として使用した。この演習の結果を検証コール頻度（VCF）として表にし、表Aに要約する。

【0162】

予測性能の推定値としてGARD呼吸器予測シグネチャーを使用した独立試験化合物の視覚的分類

呼吸器感作物質の予測アッセイとしてのゲノムバイオマーカーシグネチャーの関連性を説明するために、呼吸器感作物質及び呼吸器非感作物質の両方を含む独立試験データセットを使用してGRPSの予測性能を検証した。独立試験データセットに含まれた化学化合物を表2に記載する。1-ブタノール、クロロベンゼン、エチレンジアミン、無水フタル酸、及び媒体対照（DMSO、蒸留水）等のモデル訓練中に使用した化合物のうちのいくつかを、対照として使用されるように独立試験データセットにも含めた。試料分類前に残りの化学物質をモデルで確認することができなかった。独立試験データセット中のすべての化学物質は、訓練データセットを含む刺激から時間的に分離されたさらなる刺激に基づいた。したがって、モデルを過剰適合するリスクを冒すことなく、GRPSの特定中にモデルで確認されなかった化合物及び確認された化合物の両方を分類することができた。細胞を24時間刺激した後、mRNAを収集し、cDNAに変換し、マイクロアレイにハイブリダイズした。刺激は、6個の呼吸器感作物質、19個の呼吸器非感作物質、及び媒体対照（DMSO、蒸留水）を含んだ。先の一組の実験[41]の呼吸器非感作刺激を再使用し、生物学的に三連で行った。呼吸器非感作物質1-ブタノールと一緒に呼吸器感作物

質で行った刺激は、新規のラウンドの刺激を含み、これを生物学的に二連で行った。化学物質クロロベンゼンを内部制御のために両セットに含め、それ故に合計5つの刺激を含んだ。加えて、媒体対照DMSO及び蒸留水を、それぞれ、13個の複製物及び9個の複製物で分析した。要約すると、独立試験データセットは、92個のアレイを構成した。方法論を強調するために試験データセットを使用して、未知の試料の可視化分類を行うプロセスを図3に連続的に示す。初期ステップで、訓練データセット、すなわち、予測GRPSゲノムバイオマーカーシグネチャーを特定するために使用された基準化学物質のパネルを最初に使用して、PCA空間を生成し、可変入力としてGRPSの389個の遺伝子を使用した。その後、PCAを空間内にフリーズさせ、これらの化合物がPCA成分に影響を及ぼすことを許容することなく、試験データセット中の化合物を各々この空間にプロットしたPCA成分(図3A)。図3Bに示されるように、試験データセット中の試料の真のアイデンティティーの特定時に、訓練データ及び試験データの両方の第1のPCA成分に沿った呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質との明らかな分離を見ることができ、呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質との間のGRPSにおける遺伝子発現の類似性及びその構造の差異が試験データセットにも存在することを示す。図3Cは、訓練データセットにより生成されたフリーズしたPCA空間にプロットした試験データセットを示すが、解釈を助けるために訓練データセットを取り除いた。図に見られるように、呼吸器感作物質及び呼吸器非感作物質は、第2及び第3の主成分によって生成された超平面により分離されているように見え、GRPSが独立試験データセットで見られなかった試料における呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質との区別を達成するための関連情報を明らかに含んでいることを示す。

10

20

【0163】

SVMの分類及びGRPSの予測性能

独立試験データセット中の試料を分類する連続的ステップで、教師ありマシン学習用のSVMを使用して、視覚的分類物を二値分類モデルで刺激した。SVMを訓練データセットで訓練して、GRPS内での呼吸器感作物質と呼吸器非感作物質との間の遺伝子発現の構造の差異を認識した。訓練したSVMモデルを適用して、呼吸器感作物質または呼吸器非感作物質のいずれかとして各個々の複製物レベルで独立試験データセット中の各試料を分類した。SVMからの出力であるSVM決定値を試験データセット中の試料の真のアイデンティティーと比較し、ROC-AUC分析を使用して予測子の性能を評価し、結果を図4に示す。SVM分類は、線形カーネルに基づき、不偏最大マージン超平面がこれらの2つの群を分離し、それ故に、呼吸器感作物質としての分類の閾値は、0を超えるSVM決定値に相当する。図に示されるように、個々の刺激レベルでのGRPSの予測子性能がROC曲線下面積0.97であると推定した。試験データセット中の各化学化合物のSVM分類から得られた決定値を表3に提示する(n=70、媒体対照を除く)。この表に提示されたデータを図5にさらに要約する。図5中、試料は、最も高いSVM値から最も低いSVM値の降順で分類されており、試験データセット中の各化合物のSVM決定値は、GRPS中の389個の転写物の個々の発現プロファイルと相関している。解釈を助けるために、図中の試料を感作能力(呼吸器感作物質=紫色、呼吸器非感作物質=濃緑色)に従って色付けし、分類の閾値を点線で示す。図に示されるように、いくらかの重複が観察されるが、呼吸器感作物質の大半は、呼吸器非感作物質に割り当てられた対応する値よりも高いSVM決定値に割り当てられ、これは、各群の大半の化合物間の発現プロファイルの差とも相関している。各化学物質の感作能力を決定及び分類するために、我々は、複製刺激のうちのいずれかが以前に公開されたプロトコル[42]で決定された0を超えるSVM決定値を有する場合に、試験データセット中の任意の所与の試料が呼吸器感作物質に分類されるべきであることを提示するカットオフの使用を選択した。この判断基準に基づいて、クーパー統計値を使用して、GRPSの精度、感度、及び特異度を、それぞれ、84%、67%、及び89%と推定した。

30

40

【0164】

呼吸器感作物質に関連した標準経路及びGARD予測シグネチャー

50

MUTZ-3細胞における呼吸器化学感作物質によって引き起こされた生物学的応答を調査するために、Metacore（商標）における機能エンリッチメント分析を使用してデータを分析した。p値フィルタリングから選択した上位999個の遺伝子を、Metacore（商標）への入力として使用した。Metacore（商標）は、これらの999個の遺伝子のうち948個を一意的IDにマッピングすることができた。著しく制御された経路（ $p = 0.01$ 未満）を表4に列記し、 $-\log(p)$ 値で順位付けし、統計的有意性が高い順に分類した。GRPS中に存在する遺伝子を[]で示す。これらの特定された著しく制御された経路の過半数は、制限された組の分子によって主に駆動される。最も密集度の高い経路は、酸化リン酸化（26個の分子）及びユビキノン代謝（19個の分子）を含んでおり、酸化還元プロセス及び呼吸器電子伝達系機能等の細胞事象がこれらの研究されている化学物質の影響を大いに受けていることを示す。加えて、T細胞における阻害PD-1シグナル伝達、MHCクラスI及びMHCクラスIIによる抗原提示、メモリーCD4+T細胞の生成、IL-33シグナル伝達経路等のそれほど著しく制御されていない経路のうちのいくつかは、免疫学的観点から関連性がある。注目すべきことに、これらの経路の多くの中心が先天性免疫と適応性免疫との間の架け橋であり、先天性免疫応答の関与が外来物質の認識によって引き起こされ、樹状細胞成熟及び特異的T細胞応答の活性化につながる。MHCクラスI及びMHCクラスII複合体等の抗原提示関連分子の上方制御、CD80及びCD86等の共刺激分子の上方制御、ならびに免疫応答の駆動に関与する経路を引き起こし、かつ協調することによるT細胞等の中心的存在とのクロストークを含むこのプロセスの重要な態様は、MUTZ-3細胞株において十分に監視され、著しく制御される。注目すべきことに、活性化された経路は、非常に限定的な程度にのみMUTZ-3における皮膚感作物質によって活性化された経路と重複し（グランザイムB及びグランザイムAシグナル伝達）[54]、呼吸器感作物質及び皮膚感作物質が異なるシグナル伝達経路の関与に関わることを示す。

10

20

【0165】

考察

様々な化学物質が、皮膚及び呼吸管の両方でアレルギー性過敏性反応を誘導することができ、最終的にはアレルギー性接触皮膚炎（ACD）または職業性喘息（OA）の臨床症状を引き起こす。皮膚感作を引き起こす化学物質と比較して呼吸器感作を誘導することができる化学物質の数ははるかに少ないが、後天性OAに関連した健康及び生活の質に深刻な影響を与えるため、呼吸器化学感作物質の特定及び危険分類は、依然として重大な分野である。呼吸器感作物質を正確に特定する信頼できるアッセイの開発、ならびにそれらの皮膚感作物質との区別は困難であると証明されている。過去の研究では、我々は、皮膚感作化学物質の特定及びリスク評価のための動物試験に代わるインビトロ代替物としてのゲノムアレルゲン迅速検出（GARD）アッセイの開発及び適用について説明した。GARDアッセイでは、ゲノム規模での転写プロファイリングによって測定された所定のゲノムバイオマーカーシグネチャーからの読み出しに基づいて、未知の試験化学物質を分類する。完全なトランスクリプトームの分析をもたらす高い多用途性を利用して、我々は、GARDの適用性ドメインが広がって代替のゲノムバイオマーカーシグネチャーの特定により呼吸器感作物質の危険分類も網羅すると仮定した。

30

40

【0166】

現在の研究では、我々は、GARD呼吸器予測シグネチャー（GRPS）と名付けた異なるバイオマーカーシグネチャーを使用して呼吸器感作化学物質の分類を可能にするGARDのさらなる開発を提示する。したがって、定義されたGRPSは、MUTZ-3細胞を分類される未知の化合物で刺激する新規の組み合わせインビトロアッセイにおける使用が意図されている。注目すべきことに、2つのはっきりと異なるバイオマーカーシグネチャーを使用して、化合物を、皮膚感作物質、呼吸器感作物質、または非感作物質のいずれかに分類することができる。呼吸器感作及び皮膚感作の両方を誘導することができる化学物質を、そのようなものとして明確に分類する。

【0167】

50

呼吸器感作物質または呼吸器非感作物質のいずれかとして既知の一組の基準化学物質を使用して、GRPSを特定した。その後、これらの2つの群における差別的に制御された遺伝子をANOVA p値フィルタリングにより特定し、社内で開発された変数減少のラッパーアルゴリズムを使用してさらに最適化した。我々は、GRPS中の389個の遺伝子がゲノムバイオマーカーシグネチャーとして機能して、呼吸器感作化学物質と呼吸器非感作化学物質とを区別することができることを示唆する。GRPSの予測性能の評価は、呼吸器感作物質の特定のためのゲノムバイオマーカーシグネチャーの信頼性を確立するのに重要である。この研究では、我々は、教師ありマシン学習用のサポートベクターマシン(SVM)アルゴリズムを使用した。我々は、このモデルを訓練して、特定されたGRPSゲノムバイオマーカーシグネチャーにおける遺伝子発現データの構造及び類似性を認識し、このモデルで確認されていない化学物質を含む独立試験セットでこのモデルを刺激した。その後、我々は、このモデルを使用して、この確認されていない化学化合物を呼吸器感作物質または呼吸器非感作物質のいずれかとして二値分類した。この演習を行うことにより、我々は、正確な予測を達成するGRPSの潜在能力を実証した。ROC AUC分析及びクーパー統計値を使用してGRPSの予測性能を推定し、0.97のROC曲線下面積、ならびにそれぞれ、67%、89%、及び84%の感度、特異度、及び精度を達成した。これは、呼吸器感作を誘導する化学物質の危険分類の報告された最も高い精度である。

【0168】

現在のところ、我々は、何故GRPSが予測時に皮膚感作物質のGPSと同じ高さの感度に到達しないのかの考えられる説明についての仮説を立てることしかできない[46]。これは、一部には、GPSと比較してGRPSのアッセイ開発中により少ない数の基準化合物しか使用しなかったことに起因し得るが、恐らく、別の考えられる説明を分子レベルで見つけることができ、すなわち、皮膚感作物質がMUTZ-3細胞における遺伝子発現のより強力な制御因子であるという説明を見つけることができる。それとは無関係に、分類のための読み出しとしての全ゲノムアレイの使用は、GRPSを依然として非常に柔軟性のあるものにする。より多くの試料が分析されると、さらなる情報がこのアッセイに容易に組み入れられて、感度、特異度、及び精度を改善し、利用可能な化学化合物の多様性を反映するための方法を微調整することができる。

【0169】

MUTZ-3への感作化学物質の生物学的影響をさらに探索するために、エンリッチメント分析を行った。データにおいて十分な有意性を達成するために、GRPSの上位389個の遺伝子ではなく、p値フィルタリングからの上位999個の遺伝子をMetacore(商標)ソフトウェアにおける入力として使用した。紛れもなく、呼吸器感作物質によって引き起こされた最も密集度の高い経路は、酸化還元プロセス及び呼吸器電子伝達系等の細胞事象に関連した(表4を参照のこと)。これらの分子は、p値フィルタリング手順からの上位の遺伝子であり、GRPSシグネチャーには存在しない。この点において、機能性(この場合、転写物の生物学的関連性を説明することを目的とする)とGRPS予測プロファイル(独立試料の正確な分類を行うことを目的とする)とを区別することが重要である。酸化的リン酸化及びユビキノン代謝経路に関連する分子のうちのいくつかは、タンパク質複合体のサブユニットであり、それ故に空間的かつ時間的に連結している。この研究の特徴選択中に適用した変数減少手順は、変数の直交選択に基づいており、それ故に、直交情報に寄与しない特徴をこのプロセス中に取り除いた。したがって、例えば、分子複合体のサブユニットが同様の発現パターンを有する可能性があるため、著しく制御された経路のうちのいくつかはGRPSシグネチャーからの転写物を含まなかったか、または数個しか含まなかったことは驚くべきことではなく、予想されていることである。あまり活性化されていない経路のうちのいくつかに基づいて、化学的呼吸器アレルゲンへのMUTZ-3における生物学的応答は、最終的に細胞成熟をもたらす先天性免疫応答シグナル伝達経路の制御も伴い、抗原提示の強化及び他の免疫細胞との相互作用につながる。さらに、タンパク質アレルゲンへの呼吸器感作と以前に関連付けられていたシグナル伝達経

路の使用の新規の所見は、化学アレルゲンに応答して呼吸器感作をもたらす生物学的プロセスに光を当てるであろう。したがって、GRPSは、実際に、免疫学的機構的視点から関連性があり、呼吸器感作をもたらす生物的事象を監視する転写物の測定を提供する。

【0170】

さらに、エンリッチメント分析の結果は、GARDアッセイについて提示された結果とともに、MUTZ-3が皮膚感作物質及び呼吸器感作物質の両方の予測に好適なモデルであることを示す。免疫生物学的機構のいくつかの類似性にもかかわらず、皮膚感作と呼吸器感作との間に重大な機構的相違が存在する。皮膚感作が、Th1細胞の誘導に主に関連しており、細胞毒性CD8+T細胞応答ならびにIL-2及びインターフェロン(IFN)- γ の分泌を促進する一方で、呼吸器感作は、一般に、CD4+Th2細胞を伴い、高レベルのIL-4、IL-10、及びIL-13を特徴とする。タンパク質抗原への呼吸器感作が特異的IgE抗体の産生によって引き起こされるが、化学的アレルゲンへの呼吸器アレルギーの発症中にIgE抗体がどのような役割を果たし、IgE抗体の産生とは無関係の呼吸器感作が達成され得る機構が存在するかは依然として不明である[55、56]。IgEを必要とすることなく、誘導されたTh2応答が呼吸器感作の発症を支援するのに十分であり得ることが示唆されている[57]。T細胞応答に明らかな差異があるが、樹状細胞(DC)活性化は、皮膚感作及び呼吸器感作の両方に共通している。その結果として、DCは、生体異物化合物に応答した免疫応答の開始、調節、及び分極中のそれらの生理学的役割のため、皮膚感作及び呼吸器感作の両方の観点でアッセイの開発の天然標的である。MUTZ-3細胞株は、発現プロファイル及び特異的T細胞応答を活性化する能力の観点で、初代樹状細胞(DC)と似ている[45]。初代DCと比較して、MUTZ-3は、標準化プロトコルを使用して容易に成長し、持続可能な細胞源を提供し、このアッセイをハイスループット形式に高める機会を提供する。

【0171】

皮膚感作及び呼吸器感作の両方のアッセイの開発に即して、命名法の裏にある形式的意味を認識することが重要である。他[24、58～60]と同様に、我々は、この研究において、初期曝露の経路ではなく免疫学的応答の局所部位を示す専門用語を使用する。例えば、呼吸器の感作が関連化学物質への皮膚曝露後にも生じ得ることが示されている[61～63]。一般に、ある特定の化学化合物は、皮膚または呼吸器を選択的に感作させる。しかしながら、ある特定の状況下で、かつ免疫学的に感染しやすい個体において、いくつかの化学物質は、両方の種類の感作を引き起こすことが示されている。例えば、化学物質トリグリシジルイソシアヌレート(TGIC)がOA及びACDの両方を引き起こすことが示されている[64]。

【0172】

最後に、GARDアッセイのアプローチは、他の代替方法と比較して、いくつかの利点を有する。我々のデータ駆動型方法論を使用して、我々は、呼吸器感作物質がどのように感染しやすい個体において免疫学的応答を誘発するかの正確な機構に関する現在の知識不足に関連した問題を回避することができた。第2に、トランスクリプトーム規模でのアプローチによって得られた大量の情報は、呼吸器感作プロセスに関与する特異的シグナル伝達または代謝経路等の分子機構を解明するさらなる機会を提供する。

【0173】

この研究の主な目的は、呼吸器感作の予測のために、動物実験の減少、改良、及び代用という3大Rの原理に従ってインビトロ方法を開発することであった。モデルを一組の基準化学物質で訓練することにより、我々は、未知の化学物質が呼吸器非感作物質または呼吸器感作物質として挙動する可能性があるかを決定するツールを提示する。将来的には、化学物質が呼吸器においてどのように感作を引き起こすかの現在の知識不足が補われ続けているため、皮膚感作の有害転帰経路(AOP)の策定[67]と同様の意見の一致が呼吸器感作物質の試験においても現実になり得る。その結果、GRPSは、DC成熟の評価に有用な統合試験戦略(ITS)の魅力的な部分になるであろう。

【0174】

結論として、この研究は、皮膚感作物質を評価するための前述のGARDアッセイを補完するMUTZ-3細胞中の呼吸器化学感作物質の分類のための予測バイオマーカーシグネチャーを提示する。同じ試料における2つの異なる終点を試験する能力により、動物実験の減少、改良、及び代用という3大Rの原理に準拠するインビトロ試験戦略における化学物質の安全性を評価するための魅力的かつ現在に至るまで特有のアッセイが提供される。

【0175】

参考文献

1. Boverhof DR, Billington R, Gollapudi BB, Hotchkiss JA, Krieger SM, et al. (2008) Respiratory sensitization and allergy: current research approaches and needs. *Toxicol Appl Pharmacol* 226:1-13. 10
2. Banks DE, Tarlo SM (2000) Important issues in occupational asthma. *Curr Opin Pulm Med* 6:37-42.
3. Sastre J, Vandenplas O, Park HS (2003) Pathogenesis of occupational asthma. *Eur Respir J* 22:364-373.
4. Zammit-Tabona M, Sherkin M, Kijek K, Chan H, Chan-Yeung M (1983) Asthma caused by diphenylmethane diisocyanate in foundry workers. Clinical, bronchial provocation, and immunologic studies. *Am Rev Respir Dis* 128:226-230. 20
5. Bernstein DI, Patterson R, Zeiss CR (1982) Clinical and immunologic evaluation of trimellitic anhydride- and phthalic anhydride-exposed workers using a questionnaire with comparative analysis of enzyme-linked immunosorbent and radioimmunoassay studies. *J Allergy Clin Immunol* 69:311-318. 30
6. Murdoch RD, Pepys J, Hughes EG (1986) IgE antibody responses to platinum group metals: a large scale refinery survey. *Br J Ind Med* 43:37-43.
7. Docker A, Wattie JM, Topping MD, Luczynska CM, Newman Taylor AJ, et al. (1987) Clinical and immunological investigations of respiratory disease in workers using reactive dyes. *Br J Ind Med* 44:534-541. 40
8. Bourne MS, Flindt ML, Walker JM (1979) Asthma due to industrial use of chloramine. *Br Med J* 2:10-12.
9. Tarlo SM, Lemiere C (2014) Occupational asthma. *N Engl J Med* 370:640-649.

【0176】

10. EU (2008) Regulation (EC) no 1272/2008 of the European Parliament and of the Coun 50

cil on classification, labeling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/768/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) no 1907/2006. Annex VI with tables 3.1 and 3.2. Official Journal of the European Union L353/1.

11. Bharadwaj A, Agrawal DK (2004) Immunomodulation in asthma: a distant dream or a close reality? *Int Immunopharmacol* 4:495–511.

12. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ (1999) Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 104:1001–1006.

13. Kopferschmitt-Kubler MC, Ameille J, Popin E, Calastrenge-Crinquand A, Vervloet D, et al. (2002) Occupational asthma in France: a 1-yr report of the observatoire National de Asthmes Professionnels project. *Eur Respir J* 19:84–89.

14. Munoz X, Cruz MJ, Orrioles R, Bravo C, Espuga M, et al. (2003) Occupational asthma due to persulfate salts: diagnosis and follow-up. *Chest* 123:2124–2129.

【0177】

15. Orrioles R, Costa R, Albanel M, Alberti C, Castejon J, et al. (2006) Reported occupational respiratory diseases in Catalonia. *Occup Environ Med* 63:255–260.

16. Verstraelen S, Bloemen K, Nelissen I, Witters H, Schoeters G, et al. (2008) Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicol In Vitro* 22:1419–1431.

17. Pauluhn J, Eidmann P, Mohr U (2002) Respiratory hypersensitivity in guinea pigs sensitized to 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI): comparison of results obtained with the monomer and homopolymers of HDI. *Toxicology* 171:147–160.

18. Hilton J, Dearman RJ, Boylett MS, Fielding I, Basketter DA, et al. (1996) The mouse IgE test for the identification of potential chemical respiratory allergens: considerations of stability and controls. *J Appl Toxicol* 16:165–170.

19. Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I (1992) Variable effects of chemical allergens on serum IgE concentration in mice. *Preliminary*

10

20

30

40

50

minary evaluation of a novel approach to the identification of respiratory sensitizers. *J Appl Toxicol* 12:317-323.

20. Arts JH, Droge SC, Spanhaak S, Bloksma N, Penninks AH, et al. (1997) Local lymph node activation and IgE responses in brown Norway and Wistar rats after dermal application of sensitizing and non-sensitizing chemicals. *Toxicology* 117:229-234.

【0178】

21. Warbrick EV, Dearman RJ, Kimber I (2002) Induced changes in total serum IgE concentration in the Brown Norway rat: potential for identification of chemical respiratory allergens. *J Appl Toxicol* 22:1-11.

22. Dearman RJ, Kimber I (2001) Cytokine fingerprinting and hazard assessment of chemical respiratory allergy. *J Appl Toxicol*

21:153-163.

23. Dearman RJ, Kimber I (1999) Cytokine fingerprinting: characterization of chemical allergens. *Methods* 19:56-63.

24. Vanoirbeek JA, Tarkowski M, Vanhooren HM, De Vooght V, Nemery B, et al. (2006) Validation of a mouse model of chemical-induced asthma using trimellitic anhydride, a respiratory sensitizer, and dinitrochlorobenzene, a dermal sensitizer. *J Allergy Clin Immunol* 117:1090-1097.

25. Scheerens H, Buckley TL, Davidse EM, Garssen J, Nijkamp FP, et al. (1996) Toluene diisocyanate-induced in vitro tracheal hyperreactivity in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 154:858-865.

【0179】

26. (EU) D (2010) DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Official Journal of the European Union.

27. Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, et al. (2009) Gene profiles of THP-1 macrophages after in vitro exposure to respiratory (non-) sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. *Toxicol In Vitro* 23:1151-1162.

28. Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, et al. (2009) Gene

10

20

30

40

50

profiles of a human bronchial epithelial cell line after in vitro exposure to respiratory (non-) sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. *Toxicology* 255:151-159.

29. Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, et al. (2009) Gene profiles of a human alveolar epithelial cell line after in vitro exposure to respiratory (non-) sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. *Toxicol Lett* 185:16-22.

30. Huang S, Wiszniewski L, Constant S, Roggen E (2013) Potential of in vitro reconstituted 3D human airway epithelia (MucilAir) to assess respiratory sensitizers. *Toxicol In Vitro* 27:1151-1156.

【0180】

31. Lalko JF, Kimber I, Dearman RJ, Gerberick GF, Sarlo K, et al. (2011) Chemical reactivity measurements: potential for characterization of respiratory chemical allergens. *Toxicol In Vitro* 25:433-445.

32. Isola D, Kimber I, Sarlo K, Lalko J, Sipes IG (2008) Chemical respiratory allergy and occupational asthma: what are the key areas of uncertainty? *J Appl Toxicol* 28:249-253.

33. Kimber I, Agius R, Basketter DA, Corsini E, Cullinan P, et al. (2007) Chemical respiratory allergy: opportunities for hazard identification and characterisation. The report and recommendations of ECVAM workshop 60. *Altern Lab Anim* 35:243-265.

34. Mehling A, Eriksson T, Eltze T, Kolle S, Ramirez T, et al. (2012) Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials. *Arch Toxicol* 86:1273-1295.

35. Basketter DA, Evans P, Fielder RJ, Gerberick GF, Dearman RJ, et al. (2002) Local lymph node assay-validation, conduct and use in practice. *Food Chem Toxicol* 40:593-598.

【0181】

36. Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, et al. (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line

Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro* 20:767-773.

37. Nukada Y, Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Mugita N, et al. (2011) Predictive performance for human skin sensitizing potential of the human cell line activation test (h-CLAT). *Contact Dermatitis* 65:343-353.

38. Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, et al. (2004) Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci* 81:332-343.

39. Natsch A (2010) The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers—functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol Sci* 113:284-292.

40. Andreas N, Caroline B, Leslie F, Frank G, Kimberly N, et al. (2011) The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol In Vitro* 25:733-744.

【0182】

41. Johansson H, Lindstedt M, Albrekt AS, Borrebaeck CA (2011) A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomics* 12:399.

42. Johansson H, Albrekt AS, Borrebaeck CA, Lindstedt M (2013) The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. *Toxicol In Vitro* 27:1163-1169.

43. Santegoets SJ, Masterson AJ, van der Sluis PC, Loughheed SM, Fluitsma DM, et al. (2006) A CD34(+) human cell line model of myeloid dendritic cell differentiation: evidence for a CD14(+) CD11b(+) Langerhans cell precursor. *J Leukoc Biol* 80:1337-1344.

44. Masterson AJ, Sombroek CC, De Gruijl TD, Graus YM, van der Vliet HJ, et al. (2002) MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood* 100:701-703.

45. Larsson K, Lindstedt M, Borrebaeck CA (2006) Functional and transcriptional profiling of MUTZ-3, a myeloid cell line actin

10

20

30

40

50

g as a model for dendritic cells. Immunology 117:156-166.

【0183】

46. Johansson H, Rydnert F, Kuhn J, Schepky A, Borrebaeck C, et al. (2014) Genomic allergen rapid detection in-house validation—a proof of concept. Toxicol Sci 139:362-370.

47. Haneke KE, Tice RR, Carson BL, Margolin BH, Stokes WS (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Data analyses completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. Regul Toxicol Pharmacol 34:274-286.

10

48. Vanoirbeek JA, Mandervelt C, Cunningham AR, Hoet PH, Xu H, et al. (2003) Validity of methods to predict the respiratory sensitizing potential of chemicals: A study with a piperidiny chlorotriazine derivative that caused an outbreak of occupational asthma. Toxicol Sci 76:338-346.

20

49. Holsapple MP, Jones D, Kawabata TT, Kimber I, Sarlo K, et al. (2006) Assessing the potential to induce respiratory hypersensitivity. Toxicol Sci 91:4-13.

50. Kimber I, Basketter DA, Butler M, Gamer A, Garrigue JL, et al. (2003) Classification of contact allergens according to potency: proposals. Food Chem Toxicol 41:1799-1809.

30

【0184】

51. OECD (2002) Guideline 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay (2002).

52. Carlsson A, Wingren C, Kristensson M, Rose C, Ferno M, et al. (2011) Molecular serum portraits in patients with primary breast cancer predict the development of distant metastases. Proc Natl Acad Sci U S A 108:14252-14257.

40

53. Kullback S, Leibler RA (1951) On Information and Sufficiency. Annals of Mathematical Statistics 22:79-86.

54. Albrekt AS, Johansson H, Borje A, Borrebaeck C, Lindstedt M (2014) Skin sensitizers differentially regulate signaling pathways in MUTZ-3 cells in relation to their individual potency. BMC Pharmacol Toxicol 15:5.

50

55. Cartier A, Grammer L, Malo JL, Lagier F, Ghezze H, et al. (1989) Specific serum antibodies against isocyanates: association with occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 84:507-514.

【0185】

56. Cullinan P (1998) Occupational asthma, IgE and IgG. *Clin Exp Allergy* 28:668-670.

57. Kimber I, Dearman RJ, Basketter DA, Boverhof DR (2014) Chemical respiratory allergy: reverse engineering an adverse outcome pathway. *Toxicology* 318:32-39.

58. Vanoirbeek JA, Tarkowski M, Ceuppens JL, Verbeken EK, Nemery B, et al. (2004) Respiratory response to toluene diisocyanate depends on prior frequency and concentration of dermal sensitization in mice. *Toxicol Sci* 80:310-321.

59. Sailstad DM, Ward MD, Boykin EH, Selgrade MK (2003) A murine model for low molecular weight chemicals: differentiation of respiratory sensitizers (TMA) from contact sensitizers (DNFB). *Toxicology* 194:147-161.

60. Pauluhn J (2003) Respiratory hypersensitivity to trimellitic anhydride in Brown Norway rats: analysis of dose-response following topical induction and time course following repeated inhalation challenge. *Toxicology* 194:1-17.

【0186】

61. Karol MH, Hauth BA, Riley EJ, Magreni CM (1981) Dermal contact with toluene diisocyanate (TDI) produces respiratory tract hypersensitivity in guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 58:221-230.

62. Kimber I, Dearman RJ (2002) Chemical respiratory allergy: role of IgE antibody and relevance of route of exposure. *Toxicology* 181-182:311-315.

63. Bello D, Herrick CA, Smith TJ, Woskie SR, Streicher RP, et al. (2007) Skin exposure to isocyanates: reasons for concern. *Environ Health Perspect* 115:328-335.

64. Meuleman L, Goossens A, Linders C, Rochette F, Nemery B (1999) Sensitization to triglycidylisocyanurate (TGIC) with cutaneous and respiratory manifestations. *Allergy* 54:752-756.

65. Cary R, Dobson S, Delic J (1999) Concise

10

20

30

40

50

International Chemical Assessment Document 15 (CICAD) : 1, 2-DIAMINOETHANE (ETHYLENEDIAMINE) World Health Organization.

【0187】

66. Commission E (2005) European Union Risk Assessment Report Piperazine. European Chemicals Bureau: European commission. 159 p.

67. OECD (2012) The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168.

68. Hu ZB, Ma W, Zaborski M, MacLeod R, Quentmeier H, et al. (1996) Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3. *Leukemia* 10:1025-1040.

69. Quentmeier H, Duschl A, Hu ZB, Schnarr B, Zaborski M, et al. (1996) MUTZ-3, a monocytic model cell line for interleukin-4 and lipopolysaccharide studies. *Immunology* 89:606-612.

70. Piccolo SR, Sun Y, Campbell JD, Lenburg ME, Bild AH, et al. (2012) A single-sample microarray normalization method to facilitate personalized-medicine workflows. *Genomics* 100:337-344.

【0188】

71. Johnson WE, Li C, Rabinovic A (2007) Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 8:118-127.

72. R Development Core Team (2014) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.

73. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, et al. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80.

74. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD sva: Surrogate Variable Analysis. R package version 3.6.0.

75. Ringner M (2008) What is principal component analysis? *Nat Biotechnol* 26:303-304.

10

20

30

40

50

【0189】

76. Benjamini Y HY (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological) 57:12.
77. Lasko TA, Bhagwat JG, Zou KH, Ohno-Machado L (2005) The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics. J Biomed Inform 38:404-415. 10
78. Dimitriadou E, Hornik K, Leisch F, Meyer D, Weingessel A. (2011) e1071: Miscellaneous functions of the Department of statistics (q1071). TU Wien R package version 1.6 <http://CRAN.R-project.org/package=e1071>.
79. Cortes CV, V. (1995) Support-Vector Networks. Machine Learning 20:273-297.
80. Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T (2005) ROCr: visualizing classifier performance in R. Bioinformatics 21:3940-3941. 20
81. Cooper JA, 2nd, Saracci R, Cole P (1979) Describing the validity of carcinogen screening tests. Br J Cancer 39:87-89.

【0190】

表A. GPRS予測シグネチャーのバイオマーカー

【0191】

【表1】

表A (i) -コアバイオマーカー

30

			A f f y m e t r i x	検証コー ル頻度 ¹
遺伝子 I D	E n s e m b l	転写物 I D	プローブ セット I D	
1. TNFRSF19	ENST00000403372		7968015	100
2. SNORA74A	NR_002915		8108420	100
3. SPAM1	ENST00000340011		8135835	100

【0192】

【表 2】

表A (i i) -好ましいバイオマーカー

4.	ETID:ENST00000364621	ENST00000364621	7917972	95	
5.	HOMER3	ENST00000392351	8035566	95	
6.	CD1C	ENST00000368169	7906348	90	
7.	IGHD///IGHM	ENST00000390538	7981601	90	
8.	SNRPN///SNORD116-26	NR_003340	7982000	90	
9.	ETID:ENST00000364678	ENST00000364678	7934896	85	
10.	STRAP	ENST00000025399	7954173	85	10
11.	DIABLO	ENST00000267169	7967230	85	
12.	ETID:ENST00000411349	ENST00000411349	8151989	85	
13.	ETID:ENST00000385497	ENST00000385497	7923037	80	
14.	OR51A2	ENST00000380371	7946017	80	
15.	MRPL21	ENST00000362034	7949995	80	
16.	PPP1R14A	ENST00000301242	8036473	80	
17.	DEFB127	ENST00000382388	8060314	80	
18.	C9orf130	ENST00000375268	8162562	80	
19.	PRO2012	BC019830	7924817	75	
20.	LOC399898	AK128188	7940116	75	20
21.	ETID:ENST00000387701	ENST00000387701	7969914	75	
22.	WDR68	ENST00000310827	8009164	75	
23.	NEU2	ENST00000233840	8049243	75	
24.	ETID:ENST00000386677	ENST00000386677	8072575	75	
25.	SPARC	ENST00000231061	8115327	75	
26.	ETID:ENST00000390342	ENST00000390342	8139107	75	
27.	CRNN	ENST00000271835	7920178	70	
28.	MMP12	ENST00000326227	7951297	70	
29.	ACVRL1	ENST00000267008	7955562	70	
30.	EIF4E2	ENST00000258416	8049180	70	30
31.	RP11-191L9.1	ENST00000380990	8076819	70	
32.	PDCD6///AHRR	ENST00000264933	8104180	70	
33.	ARRDC3	ENST00000265138	8113073	70	
34.	VWDE	ENST00000275358	8138258	70	
35.	ZBTB34	ENST00000319119	8157945	70	
36.	ITGB1BP2	ENST00000373829	8168291	70	
37.	OR10K2	ENST00000392265	7921356	65	
38.	FLJ22596	AK026249	7950442	65	
39.	ETID:ENST00000306515	ENST00000306515	8043572	65	
40.	ACVR2A	ENST00000404590	8045587	65	40

【表 3】

表A (i i) -好ましいバイオマーカー (続き 1)

41.	ETID:ENST00000385690	ENST00000385690	8092312	65	
42.	ETID:ENST00000386018	ENST00000386018	8097945	65	
43.	C6orf201	ENST00000360378	8116696	65	
44.	ETID:ENST00000385583	ENST00000385583	8136932	65	
45.	ETID:ENST00000385719	ENST00000385719	8148515	65	
46.	GPR20	ENST00000377741	8153269	65	
47.	ETID:ENST00000364357	ENST00000364357	8163084	65	10
48.	ZCCHC13	ENST00000339534	8168420	65	
49.	GPR64	ENST00000356606	8171624	65	
50.	CD1D	ENST00000368171	7906330	60	
51.	DUSP12	ENST00000367943	7906810	60	
52.	KLHL33	ENST00000344581	7977567	60	
53.	PSMB6	ENST00000270586	8003953	60	
54.	TMEM95	ENST00000396580	8004364	60	
55.	C1QBP	ENST00000225698	8011850	60	
56.	EMILIN2	ENST00000254528	8019912	60	20
57.	CD8A	ENST00000352580	8053584	60	
58.	C20orf152	ENST00000349339	8062237	60	
59.	KCNJ4	ENST00000303592	8076072	60	
60.	ETID:ENST00000364163	ENST00000364163	8078310	60	
61.	FAM19A1	ENST00000327941	8080918	60	
62.	ETID:ENST00000384601	ENST00000384601	8081233	60	
63.	POLR2H	ENST00000296223	8084488	60	
64.	AK000420	AK000420	8110706	60	
65.	ETID:ENST00000363354	ENST00000363354	8120360	60	
66.	APID:8121483	---	8121483	60	30
67.	EGFL6	ENST00000361306	8166079	60	
68.	POU3F4	ENST00000373200	8168567	60	
69.	ETID:ENST00000385841	ENST00000385841	7905629	55	
70.	OR52A5	ENST00000307388	7946023	55	
71.	TIMM8B	ENST00000280354	7951679	55	
72.	PEBP1	ENST00000261313	7959070	55	
73.	OR4F6	ENST00000328882	7986530	55	
74.	CDH15	ENST00000289746	7997880	55	
75.	TMEM199	ENST00000292114	8005857	55	40
76.	ABI3	ENST00000225941	8008185	55	
77.	FLJ42842	AK124832	8008540	55	
78.	MC4R	ENST00000299766	8023593	55	
79.	ETID:ENST00000410673	ENST00000410673	8045931	55	
80.	ISM1	ENST00000262487	8061013	55	

【表 4】

表A (i i) -好ましいバイオマーカー (続き 2)

81.	LOC440957	ENST00000307106	8080416	55	
82.	KLB	ENST00000257408	8094679	55	
83.	GM2A	ENST00000357164	8109344	55	
84.	ANXA6	ENST00000354546	8115234	55	
85.	TAS2R40	ENST00000408947	8136846	55	
86.	APID:8142880	---	8142880	55	10
87.	RARRES2	ENST00000223271	8143772	55	
88.	SH2D4A	ENST00000265807	8144880	55	
89.	PLP1	ENST00000361621	8169061	55	
90.	ATP1A2	ENST00000392233	7906501	50	
91.	ETID:ENST00000386800	ENST00000386800	7932610	50	
92.	MAT1A	ENST00000372206	7934755	50	
93.	TSGA10IP	ENST00000312452	7941469	50	
94.	PRDM7	ENST00000325921	8003571	50	
95.	ETID:ENST00000390847	ENST00000390847	8015739	50	
96.	ETID:ENST00000255183	ENST00000255183	8066444	50	20
97.	MRPL39	ENST00000307301	8069620	50	
98.	ETID:ENST00000386327	ENST00000386327	8074884	50	
99.	TIPARP	ENST00000295924	8083569	50	
100.	HES1	ENST00000232424	8084880	50	
101.	ETID:ENST00000363502	ENST00000363502	8089727	50	
102.	PRDM9	ENST00000253473	8104634	50	
103.	ETID:ENST00000390917	ENST00000390917	8137433	50	
104.	KIAA1688	ENST00000377307	8153876	50	
105.	ETID:ENST00000391219	ENST00000391219	8156759	50	30
106.	ETID:ENST00000387973	ENST00000387973	8160782	50	
107.	LOC100129534	---	7911718	45	
108.	SLC2A1	ENST00000397019	7915472	45	
109.	AF116714	AF116714	7935359	45	
110.	EPS8L2	ENST00000318562	7937443	45	
111.	MGC3196	ENST00000307366	7948836	45	
112.	7952733	---	7952733	45	
113.	ETID:ENST00000384391	ENST00000384391	7990031	45	
114.	EME2	ENST00000307394	7992379	45	
115.	NETO1	ENST00000299430	8023828	45	40
116.	NPHS1	ENST00000353632	8036176	45	
117.	ETID:ENST00000384109	ENST00000384109	8047215	45	
118.	ETID:ENST00000364143	ENST00000364143	8059799	45	
119.	ISX	ENST00000404699	8072636	45	
120.	IL17RB	ENST00000288167	8080562	45	

【表 5】

表A (i i) -好ましいバイオマーカー (続き 3)

121.	PCOLCE2	ENST00000295992	8091243	45	
122.	LRIT3	ENST00000409621	8096839	45	
123.	ETID:ENST00000330110	ENST00000330110	8104615	45	
124.	ZNF354C	ENST00000315475	8110491	45	
125.	ETID:ENST00000386444	ENST00000386444	8162927	45	
126.	OR2G3	ENST00000320002	7911209	40	10
127.	GLUL	ENST00000331872	7922689	40	
128.	CCKBR	ENST00000334619	7938090	40	
129.	OR1S2	ENST00000302592	7948312	40	
130.	DCUN1D5	ENST00000260247	7951325	40	
131.	ETID:ENST00000388291	ENST00000388291	7951420	40	
132.	EMG1	ENST00000261406	7953594	40	
133.	PTHLH	ENST00000395868	7962000	40	
134.	PTGES3	ENST00000262033	7964250	40	
135.	CIDEB	ENST00000258807	7978272	40	
136.	ETID:ENST00000383863	ENST00000383863	7985918	40	20
137.	ATP10A	ENST00000356865	7986789	40	
138.	MYO5C	ENST00000261839	7988876	40	
139.	ETID:ENST00000380078	ENST00000380078	7989951	40	
140.	PLA2G10	ENST00000261659	7999588	40	
141.	HSPE1	ENST00000409729	8047223	40	
142.	ETID:ENST00000388324	ENST00000388324	8096249	40	
143.	MYO6	ENST00000369977	8120783	40	
144.	C7orf30	ENST00000287543	8131860	40	
145.	ETID:ENST00000340779	ENST00000340779	8139828	40	
146.	LOC441245	AK090474	8139887	40	30
147.	CRIM2	ENST00000297801	8142821	40	
148.	XKR4	ENST00000327381	8146475	40	
149.	FAM110B	ENST00000361488	8146533	40	
150.	PEBP4	ENST00000256404	8149725	40	
151.	LOC644714	BC047037	8161943	40	
152.	PAPPAS	AY623011///AY623012	8163672	40	
153.	BEX4	ENST00000372691	8169009	40	
154.	HMGB4	ENST00000323936	7899905	35	
155.	ETID:BC028413///BC128516	BC028413///BC128516	7911676	35	40
156.	ETID:ENST00000363919	ENST00000363919	7928750	35	
157.	ETID:ENST00000335621	ENST00000335621	7958942	35	
158.	SOX1	ENST00000330949	7970146	35	
159.	CTSG	ENST00000216336	7978351	35	
160.	ETID:ENST00000362344	ENST00000362344	7982100	35	

【表 6】

表A (i i) -好ましいバイオマーカー (続き 4)

161.	FLJ37464	ENST00000398354	7996377	35	
162.	RAX	ENST00000334889	8023549	35	
163.	IL29	ENST00000333625	8028613	35	
164.	CEACAM20	ENST00000316962	8037482	35	
165.	ETID:ETID:ENST00000365557	ENST00000365557	8044684	35	
166.	SEC14L3	ENST00000403066	8075375	35	
167.	C3orf52	ENST00000264848	8081645	35	10
168.	FETUB	ENST00000265029	8084657	35	
169.	PIGY	ENST00000273968	8101718	35	
170.	CDH12	ENST00000284308	8111234	35	
171.	LGSN	ENST00000370657	8127380	35	
172.	ETID:ENST00000391031	ENST00000391031	8129067	35	
173.	HGC6.3	AB016902	8130824	35	
174.	tcag7.873	NM_001126493	8138797	35	
175.	T1560	ENST00000379496	8146527	35	
176.	EXOSC4	ENST00000316052	8148710	35	20
177.	TRAM1	ENST00000262213	8151281	35	
178.	APID:8159371	---	8159371	35	
179.	OR13C2	ENST00000318797	8162936	35	
180.	PLS3	ENST00000289290	8169473	35	
181.	TMEM53	ENST00000372244	7915578	30	
182.	CD1B	ENST00000368168	7921346	30	
183.	SORCS3	ENST00000393176	7930341	30	
184.	OR52E8	ENST00000329322	7946111	30	
185.	FAM160A2	ENST00000265978	7946128	30	
186.	LOC649946	BC017930	7952126	30	30
187.	FAM158A	ENST00000216799	7978114	30	
188.	APID:7986637	---	7986637	30	
189.	MYO1E	ENST00000288235	7989277	30	
190.	NUPR1	ENST00000395641	8000574	30	
191.	APID:8005433	---	8005433	30	
192.	SIGLEC15	ENST00000389474	8021091	30	
193.	2-Mar	ENST00000393944	8025421	30	
194.	LOC100131554	---	8041886	30	
195.	GGTLC1	ENST00000335694	8065427	30	
196.	PSMA7	ENST00000395567	8067382	30	40
197.	SLC25A18	ENST00000399813	8071107	30	
198.	C3orf14	ENST00000232519	8080847	30	
199.	CDX1	ENST00000377812	8109226	30	
200.	ETID:ENST00000386433	ENST00000386433	8121249	30	

【表 7】

表A (i i) ー好ましいバイオマーカー (続き 5)

201.	RRAGD	ENST00000359203	8128123	30	
202.	SDK1	ENST00000389531	8131205	30	
203.	LOC168474	NR_002789	8139826	30	
204.	ETID:ENST00000384125	ENST00000384125	8146120	30	
205.	TRHR	ENST00000311762	8147877	30	
206.	IL11RA	ENST00000378817	8154934	30	10
207.	MGC21881///LOC554249	ENST00000377616	8155393	30	
208.	ZNF483	ENST00000358151	8157193	30	
209.	C9orf169	ENST00000400709	8159624	30	
210.	MGC21881///LOC554249	ENST00000377616	8161451	30	
211.	ETID:ENST00000364507	ENST00000364507	8168161	30	
212.	ETID:ENST00000387003	ENST00000387003	7914137	25	
213.	ETID:ENST00000388083	ENST00000388083	7929614	25	
214.	ETID:ENST00000365084	ENST00000365084	7934568	25	
215.	FRG2///FRG2B///FRG2C	ENST00000368515	7937251	25	
216.	C14orf53	ENST00000389594	7975154	25	20
217.	ODF3L1	ENST00000332145	7985025	25	
218.	FAM18A	ENST00000299866	7999412	25	
219.	PRTN3	ENST00000234347	8024048	25	
220.	CFD	ENST00000327726	8024062	25	
221.	TMED1	ENST00000214869	8034101	25	
222.	ETID:ENST00000387150	ENST00000387150	8035937	25	
223.	HSD17B14	ENST00000263278	8038213	25	
224.	BOK	ENST00000318407	8049876	25	
225.	ETID:ENST00000365609	ENST00000365609	8050801	25	30
226.	SNRPB	ENST00000381342	8064502	25	
227.	EPHA6	ENST00000338994	8081138	25	
228.	SCARNA22	NR_003004	8093576	25	
229.	FLJ35424	ENST00000404649	8093821	25	
230.	ETID:ENST00000387555	ENST00000387555	8104723	25	
231.	ETID:ENST00000388664	ENST00000388664	8107115	25	
232.	ETID:ENST00000363365	ENST00000363365	8108566	25	
233.	ETID:ENST00000362861	ENST00000362861	8111358	25	
234.	ETID:ENST00000363181	ENST00000363181	8114581	25	
235.	GRM6	ENST00000319065	8116253	25	40
236.	LOC646093	---	8116400	25	
237.	HIST1H1E	ENST00000304218	8117377	25	
238.	TIAM2	ENST00000367174	8122933	25	
239.	ETID:ENST00000363074	ENST00000363074	8128712	25	
240.	ETID:ENST00000385777	ENST00000385777	8148331	25	

【表 8】

表A (i i) -好ましいバイオマーカー (続き 6)

241.	MTUS1	ENST00000400046	8149500	25	
242.	MUC21	ENST00000383351	8177931	25	
243.	WDR8	ENST00000378322	7911839	20	
244.	LOC100131195	AK097743	7933190	20	
245.	OR4D10	ENST00000378245	7940182	20	
246.	C12orf63	ENST00000342887	7957688	20	10
247.	ELA1	ENST00000293636	7963304	20	
248.	DNAJC14///CIP29	ENST00000317269	7963935	20	
249.	FLJ40176	ENST00000322527	7972670	20	
250.	ETID:ENST00000410207	ENST00000410207	7985308	20	
251.	PSME3	ENST00000293362	8007397	20	
252.	ETID:ENST00000405656	ENST00000405656	8009515	20	
253.	HN1	ENST00000356033	8018305	20	
254.	ETID:ENST00000335523	ENST00000335523	8027385	20	
255.	CYP2A7///CYP2A7P1	ENST00000301146	8036981	20	
256.	ATXN10	ENST00000252934	8073799	20	20
257.	ZMAT5	ENST00000397779	8075276	20	
258.	ETID:ENST00000362493	ENST00000362493	8084215	20	
259.	FHIT	ENST00000341848	8088458	20	
260.	FRG2///FRG2B///FRG2C	ENST00000368515	8104124	20	
261.	SNX18	ENST00000381410	8105328	20	
262.	ETID:ENST00000362433	ENST00000362433	8128445	20	
263.	DTX2	ENST00000307569	8133736	20	
264.	ASB4	ENST00000325885	8134376	20	
265.	ETID:ENST00000365242	ENST00000365242	8147445	20	
266.	ETID:ENST00000364204	ENST00000364204	8156450	20	30
267.	COL5A1	ENST00000355306	8159142	20	
268.	LCAP	ENST00000357566	8170786	20	
269.	APOO	ENST00000379226	8171823	20	
270.	PTPRU	ENST00000373779	7899562	15	
271.	IL28RA	ENST00000327535	7913776	15	
272.	NEUROG3	ENST00000242462	7934083	15	
273.	VAX1	ENST00000277905	7936552	15	
274.	LOC440131	ENST00000400540	7968323	15	
275.	C13orf31	ENST00000325686	7968883	15	40
276.	ADAMTS7	ENST00000388820	7990736	15	
277.	SMTNL2	ENST00000338859	8003892	15	
278.	LOC284112	AK098506	8012004	15	
279.	ETV2	ENST00000402764	8027920	15	
280.	FUT2	ENST00000391876	8030094	15	

【表 9】

表A (i i) -好ましいバイオマーカー (続き 7)

281.	C2orf39	ENST00000288710	8040672	15	
282.	LOC200383///DNAH6	ENST00000237449	8043071	15	
283.	ETID:ENST00000385676	ENST00000385676	8055204	15	
284.	CCDC108	ENST00000341552	8059028	15	
285.	APID:8065011	---	8065011	15	
286.	C22orf27	BC042980	8072400	15	
287.	ETID:ENST00000364444	ENST00000364444	8103041	15	10
288.	PDLIM3	ENST00000284767	8104022	15	
289.	ETID:ENST00000330110	ENST00000330110	8104613	15	
290.	ETID:ENST00000384539	ENST00000384539	8107125	15	
291.	ETID:ENST00000390214	ENST00000390214	8130372	15	
292.	MGC72080	BC029615	8141169	15	
293.	C9orf128	ENST00000377984	8161154	15	
294.	RGAG4	NM_001024455	8173503	15	
295.	PIP5K1A	ENST00000409426	7905365	10	
296.	GPR161	ENST00000367838	7922108	10	
297.	ETID:ENST00000385353	ENST00000385353	7925434	10	20
298.	OR56A3	ENST00000329564	7938066	10	
299.	OR5A2	ENST00000302040	7948377	10	
300.	WNT11	ENST00000322563	7950534	10	
301.	APID:7960259	---	7960259	10	
302.	RAB37	ENST00000340415	8009666	10	
303.	LAIR1	ENST00000391742	8039257	10	
304.	ETID:ENST00000388385	ENST00000388385	8041420	10	
305.	CHAC2	ENST00000295304	8041961	10	
306.	ETID:ENST00000387574	ENST00000387574	8062337	10	
307.	ETID:ENST00000387884	ENST00000387884	8062962	10	30
308.	BCL2L1	ENST00000376062	8065569	10	
309.	KDEL3	ENST00000409006	8073015	10	
310.	TMEM108	ENST00000321871	8082767	10	
311.	SPATA16	ENST00000351008	8092187	10	
312.	BTC	ENST00000395743	8101002	10	
313.	SUPT3H	ENST00000371460	8126710	10	
314.	EIF4B	ENST00000262056	8135268	10	
315.	CHMP4C	ENST00000297265	8147057	10	
316.	H2BFM	ENST00000243297	8169080	10	
317.	APID:8180392	---	8180392	10	40
318.	NR5A2	ENST00000367362	7908597	5	
319.	TRIM49	ENST00000332682	7939884	5	
320.	MS4A6A	ENST00000323961	7948455	5	

【表 1 0】

表A (i i) -好ましいバイオマーカー (続き 8)

321.	C11orf10	ENST00000257262	7948606	5	
322.	HSPC152	ENST00000308774	7949075	5	
323.	RASAL1	ENST00000261729	7966542	5	
324.	ETID:ENST00000387531	ENST00000387531	7975694	5	
325.	PLDN	ENST00000220531	7983502	5	
326.	PER1	ENST00000354903	8012349	5	10
327.	ALS2CR12	ENST00000286190	8058203	5	
328.	C20orf142	ENST00000396825	8066407	5	
329.	ETID:ENST00000386848	ENST00000386848	8073680	5	
330.	LOC100129113	AK094477	8074307	5	
331.	CERK	ENST00000216264	8076792	5	
332.	ETID:ENST00000385783	ENST00000385783	8083937	5	
333.	PROS1	ENST00000407433	8089015	5	
334.	PCDHGA	ENST00000378105	8108757	5	
335.	MUC3B///MUC3A	ENST00000332750	8135015	5	
336.	ETID:ENST00000365355	ENST00000365355	8142534	5	20
337.	APID:8156969	---	8156969	5	
338.	ETID:ENST00000358047	ENST00000410626	8163013	5	
339.	FAM47C	ENST00000358047	8166703	5	
340.	NXF4	ENST00000360035	8168940	5	
341.	PIWIL4	ENST00000299001	7943240	0	
342.	ETID:ENST00000384727	ENST00000384727	7968732	0	
343.	ALDH6A1	ENST00000350259	7980098	0	
344.	TMEM64	ENST00000324979	8151747	0	
345.	ETID:ENST00000364816	ENST00000364816	8168079	0	30

【 0 2 0 1】

【表 1 1】

表A (i i i) -任意のバイオマーカー

346.	C11orf73	ENST00000278483	7942932	100	
347.	OR5B21	ENST00000278483	7948330	100	
348.	NOX5///SPESP1	ENST00000395421	7984488	100	
349.	AMICA1	ENST00000356289	7952022	95	
350.	ETID:ENST00000387422	ENST00000387422	8159963	90	
351.	SERPINB1	ENST00000380739	8123598	85	10
352.	ETID:ENST00000387396	ENST00000387396	8065752	80	
353.	CD1A	ENST00000289429	7906339	75	
354.	RAB9A	ENST00000243325	8166098	75	
355.	C10orf90	ENST00000356858	7936996	70	
356.	LPXN	ENST00000263845	7948332	65	
357.	GGTLC2	ENST00000215938	8071662	65	
358.	ETID:ENST00000384680	ENST00000384680	8051862	60	
359.	PNPLA4	ENST00000381042	8171229	60	
360.	CAMK1D	ENST00000378845	7926223	55	
361.	ETID:ENST00000410754	ENST00000410754	8120979	55	20
362.	CDC123	ENST00000281141	7926207	50	
363.	WDFY1	ENST00000233055	8059361	50	
364.	hCG_1749005	---	8167640	50	
365.	CD48	ENST00000368046	7921667	45	
366.	MED19	ENST00000337672	7948293	45	
367.	DRD5	ENST00000304374	8053725	45	
368.	APID:7967586	---	7967586	40	
369.	VAPA	ENST00000340541	8020129	40	
370.	FAM71F1	ENST00000315184	8135945	40	30

【 0 2 0 2】

【表 1 2】

表A (i i i) -任意のバイオマーカー (続き)

371.	APID:8141421	---	8141421	35	
372.	HCCS	ENST00000321143	8165995	35	
373.	CNR2	ENST00000374472	7913705	25	
374.	OIT3	ENST00000334011	7928330	25	
375.	BMP2K	ENST00000335016	8096004	25	
376.	ZNF366	ENST00000318442	8112584	25	10
377.	SYT17	ENST00000396244	7993624	20	
378.	CALM2	ENST00000272298	8052010	20	
379.	XK	ENST00000378616	8166723	20	
380.	ART4	ENST00000228936	7961507	15	
381.	ETID:ENST00000332418	ENST00000332418	7997907	15	
382.	ZFP36L2	ENST00000282388	8051814	15	
383.	GSTA3	ENST00000370968	8127087	15	
384.	COL21A1	ENST00000370817	8127201	15	
385.	ETID:ENST00000332418	ENST00000332418	8170322	15	
386.	FUCA1	ENST00000374479	7913694	5	20
387.	ETID:ENST00000386628	ENST00000386628	7925821	5	
388.	AZU1	ENST00000334630	8024038	5	
389.	IL7R	ENST00000303115	8104901	5	

【 0 2 0 3】

この表は、一方向ANOVA p値フィルタリング及び変数減少によって特定されたGRPSにおける予測子遺伝子を示す。可能な場合、Ensembl転写物IDを遺伝子識別子として使用した。Human ST 1. 0アレイ用のAffymetrixプロブセットIDを提供する。

30

¹ 検証コール頻度 (%) は、交差検証によって得られた20個のバイオマーカーシグネチャー間での各予測子転写物の発生について説明する。

【 0 2 0 4】

【表 1 3】

表 Bー感作物質への曝露時の G R P S 予測子遺伝子発現傾向

プローブ I D	上方／ 下方	プローブ I D	上方／ 下方	プローブ I D	上方／ 下方	プローブ I D	上方／ 下方	
7899905	下方	7975154	上方	8062962	下方	8130824	下方	
7905365	上方	7975694	下方	8064502	上方	8131205	下方	
7905629	上方	7977567	下方	8065011	上方	8131860	上方	
7906330	上方	7978114	上方	8065427	上方	8133736	上方	10
7906339	上方	7978272	上方	8065569	下方	8134376	上方	
7906348	上方	7978351	下方	8065752	下方	8135015	上方	
7906501	下方	7980098	下方	8066407	上方	8135268	下方	
7906810	上方	7981601	下方	8066444	下方	8135835	下方	
7908597	上方	7982000	下方	8067382	上方	8135945	上方	
7911209	下方	7982100	上方	8069620	上方	8136846	上方	
7911676	上方	7983502	下方	8071107	上方	8136932	下方	
7911718	上方	7984488	上方	8071662	下方	8137433	上方	
7911839	上方	7985025	上方	8072400	下方	8138258	上方	
7913694	上方	7985308	上方	8072575	下方	8138797	上方	20
7913705	上方	7985918	下方	8072636	上方	8139107	下方	
7913776	下方	7986530	下方	8073015	下方	8139826	下方	
7914137	上方	7986637	下方	8073680	上方	8139828	下方	
7915472	上方	7986789	上方	8073799	上方	8139887	上方	
7915578	上方	7988876	上方	8074307	下方	8141169	上方	
7917972	下方	7989277	上方	8074884	上方	8141421	下方	
7920178	下方	7989951	下方	8075276	上方	8142534	下方	
7921346	上方	7990031	下方	8075375	下方	8142821	下方	
7921356	上方	7990736	下方	8076072	下方	8142880	下方	30
7921667	上方	7992379	下方	8076792	下方	8143772	下方	
7922108	下方	7993624	下方	8076819	上方	8144880	下方	
7922689	下方	7996377	上方	8078310	上方	8146120	上方	
7923037	上方	7997880	下方	8080416	上方	8146475	下方	
7924817	下方	7997907	上方	8080562	上方	8146527	下方	
7925434	下方	7999412	上方	8080847	下方	8146533	上方	
7925821	上方	7999588	上方	8080918	下方	8147057	上方	
7926207	上方	8000574	下方	8081138	上方	8147445	上方	
7926223	上方	8003571	上方	8081233	下方	8147877	上方	
7928330	上方	8003892	上方	8081645	上方	8148331	上方	40
7928750	上方	8003953	上方	8082767	上方	8148515	上方	
7929614	上方	8004364	上方	8083569	上方	8148710	上方	
7930341	下方	8005433	上方	8083937	上方	8149500	下方	

【表 1 4】

表 B－感作物質への曝露時の G R P S 予測子遺伝子発現傾向（続き 1）

7932610	上方	8005857	上方	8084215	上方	8149725	上方	
7933190	上方	8007397	上方	8084488	上方	8151281	下方	
7934083	下方	8008185	上方	8084657	上方	8151747	下方	
7934568	上方	8008540	下方	8084880	下方	8151989	上方	
7934755	上方	8009164	上方	8088458	下方	8153269	上方	
7934896	上方	8009515	上方	8089015	下方	8153876	下方	
7935359	下方	8009666	下方	8089727	下方	8154934	下方	10
7936552	下方	8011850	上方	8091243	下方	8155393	上方	
7936996	上方	8012004	上方	8092187	上方	8156450	下方	
7937251	上方	8012349	下方	8092312	下方	8156759	下方	
7937443	上方	8015739	下方	8093576	上方	8156969	上方	
7938066	上方	8018305	上方	8093821	下方	8157193	下方	
7938090	下方	8019912	上方	8094679	上方	8157945	下方	
7939884	上方	8020129	上方	8096004	下方	8159142	下方	
7940116	下方	8021091	下方	8096249	上方	8159371	上方	
7940182	上方	8023549	下方	8096839	下方	8159624	上方	20
7941469	下方	8023593	下方	8097945	下方	8159963	下方	
7942932	上方	8023828	上方	8101002	下方	8160782	下方	
7943240	下方	8024038	下方	8101718	上方	8161154	下方	
7946017	上方	8024048	下方	8103041	下方	8161451	上方	
7946023	下方	8024062	下方	8104022	下方	8161943	上方	
7946111	下方	8025421	下方	8104124	上方	8162562	下方	
7946128	下方	8027385	下方	8104180	上方	8162927	下方	
7948293	上方	8027920	下方	8104613	上方	8162936	上方	
7948312	下方	8028613	上方	8104615	上方	8163013	上方	
7948330	上方	8030094	上方	8104634	上方	8163084	下方	30
7948332	上方	8034101	上方	8104723	上方	8163672	下方	
7948377	上方	8035566	下方	8104901	下方	8165995	上方	
7948455	上方	8035937	下方	8105328	下方	8166079	下方	
7948606	上方	8036176	下方	8107115	下方	8166098	上方	
7948836	上方	8036473	下方	8107125	下方	8166703	下方	
7949075	上方	8036981	下方	8108420	上方	8166723	下方	
7949995	上方	8037482	下方	8108566	下方	8167640	下方	
7950442	下方	8038213	下方	8108757	上方	8168079	上方	
7950534	上方	8039257	下方	8109226	下方	8168161	下方	40
7951297	上方	8040672	上方	8109344	下方	8168291	上方	
7951325	上方	8041420	下方	8110491	上方	8168420	上方	

【 0 2 0 6 】

【表 1 5】

表B－感作物質への曝露時のGRPS予測子遺伝子発現傾向（続き2）

7951420	上方	8041886	下方	8110706	上方	8168567	下方	
7951679	上方	8041961	上方	8111234	下方	8168940	上方	
7952022	上方	8043071	上方	8111358	上方	8169009	下方	
7952126	上方	8043572	上方	8112584	上方	8169061	上方	
7952733	上方	8044684	上方	8113073	下方	8169080	上方	
7953594	上方	8045587	上方	8114581	下方	8169473	上方	
7954173	上方	8045931	下方	8115234	下方	8170322	上方	10
7955562	上方	8047215	下方	8115327	下方	8170786	下方	
7957688	上方	8047223	上方	8116253	上方	8171229	上方	
7958942	上方	8049180	上方	8116400	上方	8171624	下方	
7959070	上方	8049243	下方	8116696	下方	8171823	上方	
7960259	上方	8049876	上方	8117377	上方	8173503	上方	
7961507	上方	8050801	下方	8120360	上方	8177931	上方	
7962000	下方	8051814	下方	8120783	下方	8180392	上方	
7963304	下方	8051862	上方	8120979	上方			
7963935	上方	8052010	上方	8121249	下方			20
7964250	上方	8053584	下方	8121483	上方			
7966542	上方	8053725	上方	8122933	下方			
7967230	上方	8055204	下方	8123598	下方			
7967586	下方	8058203	上方	8127087	下方			
7968015	下方	8059028	下方	8127201	上方			
7968323	上方	8059361	下方	8127380	上方			
7968732	上方	8059799	上方	8128123	下方			
7968883	上方	8060314	上方	8128445	上方			
7969914	上方	8061013	上方	8128712	下方			
7970146	下方	8062237	上方	8129067	下方			30
7972670	上方	8062337	下方	8130372	下方			

【0207】

この表は、呼吸器感作物質に曝露されたMUTZ-3細胞中のGRPS予測子遺伝子の発現傾向（すなわち、上方制御または下方制御）を示す。Human ST 1.0アレイ用のAffymetrixプロブセットIDを提供する。

【0208】

【表 1 6】

表 1. アッセイ開発中に使用した各基準化合物の濃度及び媒体

化合物	略語	媒体	最大溶解度 (μ M)	R v 9 0 (μ M)	G A R D 入力濃度 (μ M)	
呼吸器感作物質						
ヘキサクロロ白金酸 アンモニウム	AH	水	3 5	—	3 5	
過硫酸アンモニウム	AP	DMSO	—	—	5 0 0	10
エチレンジアミン	EDA	水	—	—	5 0 0	
グルタルアルデヒド	GA	水	—	1 0	1 0	
ヘキサメチレンジイソ シアネート	HD I	DMSO	1 0 0	—	1 0 0	
無水マレイン酸	MA	DMSO	—	—	5 0 0	
メチレンジフェノール ジイソシアネート	MD I	DMSO	5 0	—	5 0	
無水フタル酸	PA	DMSO	2 0 0	—	2 0 0	
トルエンジイソシアネ ート	TD I	DMSO	4 0	—	4 0	
無水トリメリット酸	TMA	DMSO	1 5 0	—	1 5 0	20
呼吸器非感作物質						
1-ブタノール	BUT	DMSO	—	—	5 0 0	
2-アミノフェノール	2 AP	DMSO	—	1 0 0	1 0 0	
2-ヒドロキシエチル アクリレート	2 HA	水	—	1 0 0	1 0 0	
2-ニトロ-1, 4- フェレンジアミン	NPDA	DMSO	—	3 0 0	3 0 0	
4-アミノ安息香酸	PABA	DMSO	—	—	5 0 0	
クロロベンゼン	CB	DMSO	9 8	—	9 8	
ジメチルホルムアミド	DF	水	—	—	5 0 0	30
エチルバニリン	EV	DMSO	—	—	5 0 0	
ホルムアルデヒド	FA	水	—	8 0	8 0	
ゲラニオール	GER	DMSO	—	—	5 0 0	
ヘキシルシンナムアル デヒド	HCA	DMSO	3 2. 3 4	—	3 2. 3 4	
イソプロパノール	IP	水	—	—	5 0 0	
カトンCG*	KCG	水	—	0. 0 0 3 5 %	0. 0 0 3 5 %	
サリチル酸メチル	MS	DMSO	—	—	5 0 0	
ペニシリンG	PEN G	水	—	—	5 0 0	
プロピレングリコール	PG	水	—	—	5 0 0	40
二クロム酸カリウム	PD	水	5 1. 0 2	1. 5	1. 5	
過マンガン酸カリウム	PP	水	3 8	—	3 8	
Twee n 8 0	T 8 0	DMSO	—	—	5 0 0	
硫酸亜鉛	ZS	水	1 2 6	—	1 2 6	

【0 2 0 9】

* 化学物質カトンCGは、化合物MCとMC Iの2つの混合物である。この混合物の濃度を%で示す。

【0 2 1 0】

【表 17】

表 2. GRPS の検証に使用した独立データセットに含めた化学物質

化合物	略語	媒体	最大溶解度 (μ M)	R v 9 0 (μ M)	GARD 入 力濃度 (μ M)
呼吸器感作物質					
クロラミンT	CH-T	水	—	—	500
エチレンジアミン	EDA	水	—	—	500
イソホロンジイソシア ネート	IPDI	DMSO	25	—	25
無水フタル酸	PA	DMSO	200	—	200
ピペラジン	PPZ	水	—	—	500
反応性オレンジ	RO	水	—	100	100
呼吸器非感作物質					
1-ブタノール	BUT	DMSO	—	—	500
2, 4-ジニトロクロ ロベンゼン	DNCB	DMSO	—	4	4
2-メルカプトベンゾ チアゾール	MBT	DMSO	250	—	250
ベンズアルデヒド	BA	DMSO	250	—	250
クロロベンゼン	CB	DMSO	98	—	98
シンナミルアルコール	CALC	DMSO	500	—	500
フタル酸ジエチル	DP	DMSO	50	—	50
オイゲノール	EU	DMSO	649	300	300
グリセロール	GLY	水	—	—	500
グリオキサール	GO	水	—	300	300
イソオイゲノール	IEU	DMSO	641	300	300
乳酸	LA	水	—	—	500
オクタン酸	OA	DMSO	504	—	500
フェノール	PHE	水	—	—	500
p-ヒドロキシ安息香 酸	HBA	DMSO	250	—	250
p-フェニレンジアミ ン	PPD	DMSO	566	75	75
レゾルシノール	RC	水	—	—	500
サリチル酸	SA	DMSO	—	—	500
ドデシル硫酸ナトリウ ム	SDS	水	—	200	200

【表 1 8】

表 3. 独立試験データセットの SVM 分類結果

治療薬	SVM 決定値					分類 ¹	
	1	2	3	4	5		
						1 つの試料が 0 を超える場 合、陽性	
呼吸器感作物質							
クロラミンT	0.52	0.59				感作物質	10
エチレンジアミン	-0.32	-0.20				非感作物質	
イソホロンジイソシアネート	0.10	0.17				感作物質	
無水フタル酸	0.20	-0.12				感作物質	
ピペラジン	-0.05	-0.12				非感作物質	
反応性オレンジ	0.41	0.41				感作物質	
呼吸器非感作物質							
1-ブタノール	-0.32	0.12				感作物質	20
2, 4-ジニトロクロロベンゼン	-1.66	-1.18	-1.90			非感作物質	
2-メルカプトベンゾチアゾール	-0.44	-0.43	-0.57			非感作物質	
ベンズアルデヒド	-0.79	-0.87	-0.70			非感作物質	30
クロロベンゼン	-1.03	-0.76	-1.15	0.24	0.06	感作物質	
シンナミルアルコール	-0.57	-1.44	-1.26			非感作物質	
フタル酸ジエチル	-1.37	-0.96	-1.22			非感作物質	
オイゲノール	-1.67	-1.53	-1.51			非感作物質	
グリセロール	-1.05	-1.11	-0.77			非感作物質	
グリオキサール	-1.02	-0.69	-0.56			非感作物質	
イソオイゲノール	-1.44	-1.27	-1.32			非感作物質	
乳酸	-1.20	-0.81	-0.89			非感作物質	
オクタン酸	-0.65	-0.79	-1.22			非感作物質	
フェノール	-1.04	-0.38	-0.95			非感作物質	
p-ヒドロキシ安息香酸	-0.81	-0.56	-1.09			非感作物質	
p-フェニレンジアミン	-1.38	-1.19	-1.80			非感作物質	
レゾルシノール	-1.01	-0.99	-1.40			非感作物質	
サリチル酸	-0.73	-1.08	-1.13			非感作物質	
ドデシル硫酸ナトリウム	-1.49	-0.80	-1.30			非感作物質	

【0 2 1 2】

¹ 各化学化合物の感作特性の分類は、複製刺激のうちのいずれかが 0 を超える SVM 決定値を有する場合に試験データセット中の任意の所与の試料が呼吸器感作物質に分類されるべきであることを提示する規則に基づいた。

【0 2 1 3】

【表 19】

表 4. 呼吸器化学感作物質を呼吸器非感作物質と区別する上位 999 個の予測子に関連した標準経路

標準経路	-log (p 値)	制御された分子 ¹	
酸化リン酸化	17.62	ATP5E、ATP5I、ATPK、COX Vb、COX VIIa-2、NDUFA1、NDUFA13、NDUFA2、NDUFA3、NDUFA6、NDUFA7、NDUFA9、NDUFAB1、NDUFB10、NDUFB4、NDUFB6、NDUFB8、NDUFB9、NDUFC1、NDUFS4、NDUFS5、NDUFS6、NDUFS8、NDUFV2、UQCR10、UQCRQPC	10
ユビキノン代謝	13.29	NDUFA1、NDUFA13、NDUFA2、NDUFA3、NDUFA6、NDUFA7、NDUFA9、NDUFAB1、NDUFB10、NDUFB4、NDUFB6、NDUFB8、NDUFB9、NDUFC1、NDUFS4、NDUFS5、NDUFS6、NDUFS8、NDUFV2	20
グランザイム B シグナル伝達	4.72	Bid、カスパーゼ-2、ラミン A/C、LAMP2、[Smac/Diablo]、tBid、チューブリンアルファ	
FAS シグナル伝達カスケード	3.79	Bid、c-FLIP (S)、カスパーゼ-2、DAXX、ラミン A/C、[Smac/Diablo]、tBid	
アポトーシス促進性タンパク質 Bid、Bmf、及び Bim の細胞質輸送 / ミトコンドリア輸送	3.57	Bid、DAXX、DLC1 (Dynein LC8a)、DLC2 (Dynein LC8b)、[Smac/Diablo]、tBid	30
T 細胞における阻害 PD-1 シグナル伝達	3.27	[BCL2L1、CD8、CD8] アルファ、CD80、CD86、MHC クラス I I、PTEN	
HSP60 及び HSP70 / TLR シグナル伝達経路	3.22	CD80、CD86、MD-2、MEK1 / 2、MHC クラス I I、MyD88、ユビキチン	
成体幹細胞からの星状膠細胞の分化	3.17	[HES1]、ID1、ID2、ID3、MEK1 / 2、[SOX1]	40
アポトーシス TNF ファミリー経路	3.06	Apo-2L (TNFSF10)、[BCL2L1]、Bid、カスパーゼ-2、[Smac/Diablo]、tBid	

【0214】

【表 20】

表 4 (つづき)

標準経路	-log (p 値)	制御された分子 ¹	
TNFR1 シグナル伝達経路	3.00	Bid、c-FLIP (S)、カスパーゼ-2、jBid、[Smac/Diablo]、tBid	
細胞周期制御における Nek の役割	2.80	[ヒストンH1]、Ran、チューブリン (微小管中)、チューブリンアルファ、チューブリンベータ	10
ATP/ITP代謝	2.70	5'-NTC、ADSL、APRT、POLR2G、POLR2J、PPAP、RPB10、RPB6、[RPB8、RRP41]	
メモリーCD4+T細胞の生成	2.51	BCL2L1、CD80、CD86、[IL7RA]、MHCクラスII	
神経細胞の軸索輸送におけるダイニン-ダイナクチンモーター複合体	2.48	DYNLL、DYNLT、Tctex-1、[TMEM108]、チューブリン (微小管中)、ユビキチン	20
MHCクラスIIによる抗原提示	2.44	HLA-DM、HLA-DRA1、MHCクラスII	
IL-33 シグナル伝達経路	2.36	ヒストンH2A、ヒストンH2B、MEK1/2、MyD88、[ST2L]、ユビキチン	
インスリンの翻訳制御	2.27	eEF2、eIF4A、[eIF4B]、eIF4G1/3、MEK1 (MAP2K1)	
TNF-α誘導性カスパーゼ-8 シグナル伝達	2.23	Bid、c-FLIP (S)、カスパーゼ-2、PP2A制御分子、tBid	30
MHCクラスIによる抗原提示	2.18	[CD8]、[CD8アルファ]、PSMB5、[PSME3]	
神経線維腫症1型におけるシュワン細胞形質転換の主要経路	2.18	[BCL2L1]、[カルモジュリン]、MEK1 (MAP2K1)、MEK1/2、ニューレグリン1、PTEN	
グランザイムAシグナル伝達	2.08	[ヒストンH1]、ヒストンH2B、ラミンA/C、LAMP2	
G-CSF誘導性骨髄分化	2.08	G-CSF受容体、MEK1/2、[ミエロプラスチン]、PERM	
物質P媒介膜ブレブ形成	2.07	MRLC、チューブリン (微小管中)、チューブリンアルファ	40
アポトーシスにおける IAP-タンパク質の役割	2.03	Bid、[Smac/Diablo]、tBid、ユビキチン	

【0215】

¹ []で示した分子は、GRPS中に存在する。

【0216】

表 5. サポートベクターマシン (SVM) アルゴリズム

1. 未知のデータの SVM 予測の R スクリプト

提出したスクリプトは、traindata.txt、testdata.txt、及 50

び predictionsignature.txt に書かれており、ファイル例を提供する。

【 0 2 1 7 】

【 表 2 1 】

```
source("NaiveBayesian")
library(e1071)
```

#PART 1. USER INPUT

```
filnamnTraining<-"traindata.txt" #Provide the correct filename for traindata
filnamnTest<-"testdata.txt" #Provide the correct filename for testdata
```

```
lista <- read.delim("predictionsignature.txt",header=FALSE) ##Provide the correct filename for
the prediction signature
lista <- as.character(lista[[1]])
```

10

```
group1<- "pos" #Provide the correct label of sample class 1
group2<- "neg" #Provide the correct label of sample class 2
```

#PART 2. READ DATA

```
rawfile <- read.delim(filnamnTraining, header=FALSE)
rawfile <- t(rawfile)
samplenames <- as.character(rawfile[-1,1])
groupsTraining <- rawfile[-1,2]
dataTraining <- t(rawfile[-1,-c(1,2)])
dimdataTraining <- dim(dataTraining)
dataTraining <- as.numeric(dataTraining)
dim(dataTraining) <- dimdataTraining
ProteinNames <- as.character(rawfile[1,-c(1,2)])
rownames(dataTraining) <- ProteinNames
colnames(dataTraining) <- samplenames
logdataTraining <- dataTraining
```

20

```
listaBoolean <- is.element(ProteinNames, lista)
logdataTraining <- logdataTraining[listaBoolean,]
```

```
rawfile <- read.delim(filnamnTest, header=FALSE)
rawfile <- t(rawfile)
samplenames <- as.character(rawfile[-1,1])
groupsTest <- rawfile[-1,2]
dataTest <- t(rawfile[-1,-c(1,2)])
dimdataTest <- dim(dataTest)
dataTest <- as.numeric(dataTest)
dim(dataTest) <- dimdataTest
ProteinNames <- as.character(rawfile[1,-c(1,2)])
rownames(dataTest) <- ProteinNames
colnames(dataTest) <- samplenames
logdataTest <- dataTest
```

30

```
logdataTest <- logdataTest[listaBoolean,]
```

PART 3. TRAIN THE SVM AND USE IT TO PREDICT SAMPLE CLASS OF TEST SET

```
svmfacTraining<- factor(rep('rest',ncol(logdataTraining)),levels=c(group1, group2, 'rest'))
subset1Training<- is.element(groupsTraining , strsplit(group1,"")[[1]])
subset2Training<- is.element(groupsTraining , strsplit(group2,"")[[1]])
svmfacTraining[subset1Training] <- group1
```

40

【 0 2 1 8 】

【表 2 2】

```

svmfacTraining[subset2Training] <- group2
facTraining <- factor(as.character(svmfacTraining
[subset1Training|subset2Training]), levels=c(group1, group2))

svmfacTest<- factor(rep('rest', ncol(logdataTest)), levels=c(group1, group2, 'rest'))
subset1Test<- is.element(groupsTest , strsplit(group1, ", ")[1])
subset2Test<- is.element(groupsTest , strsplit(group2, ", ")[1])
svmfacTest[subset1Test] <- group1
svmfacTest[subset2Test] <- group2
facTest <- factor(as.character(svmfacTest
[subset1Test|subset2Test]), levels=c(group1, group2))
n1 <- sum(facTest == levels(facTest)[1])
n2 <- sum(facTest == levels(facTest)[2])
nsamples <- n1+n2
SampleInformation <- paste(levels(facTest)[1], " ", n1, " ", levels(facTest)[2], " ", n2, sep="")

svmtrain <- svm(t(logdataTraining) , facTraining , kernel="linear" )
pred<-predict(svmtrain , t(logdataTest) , decision.values=TRUE)
res<-attr(pred, "decision.values")
names <- colnames(logdataTest, do.NULL=FALSE)
orden <- order(res , decreasing=TRUE)
Samples <- data.frame(names[orden], res[orden], facTest[orden])
ROCdata <- myROC(res, facTest)
SenSpe <- SensitivitySpecificity(res, facTest)

# PART 4. IF SAMPLE CLASSES OF TEST DATA ARE KNOWN, PRINT ROC
ROCplot(list(SampleInformation=SampleInformation, ROCarea=ROCdata[1], p.value=ROCdata[2], SenSpe <- SenSpe, samples=Samples), sensspecnumber=4)

# PART 5. FOR UNKNOWN SAMPLES, PRINT DECISION VALUES
write.table(res, file="Predicted_resultsp1206.txt", sep= "t", row.names = TRUE)

```

10

20

【0 2 1 9】

2. 変数減少を使用した予測シグネチャー確立のための R スクリプト

【0 2 2 0】

【表 2 3】

```

filnamn <- "inputdata.txt" #Provide correct filename for inputdata. Correct Format should be
t(traindata).
group1 <- "pos" #Provide label of sample class 1
group2 <- "neg" #Provide label of sample class 2

# Include
source("NaiveBayesian")
library(e1071)

# Hämta data
rawfile <- read.delim(filnamn)

# Läs in grupper
groups <- rawfile[,2]

# Hämta provnamn i datafilen
samplenames <- as.character(rawfile[,1])

# Skapa dataset ur råfilen
data <- t(rawfile[, -c(1,2)])

# Log
# data <- log(data)/log(2)

# antal prover

```

30

【0 2 2 1】

40

【 表 2 4 】

```

nsamples <- ncol(data)

# Skapa antikroppsnamnlista ur NYA datafilen
ProteinNames <- read.delim(filnamn,header=FALSE)
ProteinNames <- as.character(as.matrix(ProteinNames)[1,])
ProteinNames <- ProteinNames[-(1:2)]

# Kolla antal Ab i nya datasetet
antal <- length(ProteinNames)

# Ge rätt prov- och Ab-namn
rownames(data) <- ProteinNames
colnames(data) <- samplenames

# Skapa subsets
subset1 <- is.element(groups , strsplit(group1,"")[[1]])
subset2 <- is.element(groups , strsplit(group2,"")[[1]])

# Skapa factorlista
svmfac <- factor(rep('rest',ncol(data)),levels=c(group1,group2,'rest'))
svmfac[subset1] <- group1
svmfac[subset2] <- group2
svmfac <- svmfac[subset1|subset2]

# Skapa vektor för K-L felen där det minsta för varje signaturlängd sparas
smallestErrorPerLength <- rep(NA,antal)

# Beräkna medelvärde för varje Ab över alla prov som är med
averages <- apply(data, 1, mean)

# Skapa vektor för Ab-ordningen efter K-L felen som erhållits när
# respektive antikropp var satt till medelvärde.
abOrder <- rep(NA,antal)

# Skapa ett dataset att eliminera i
elimData <- data[,subset1|subset2]

# Lista att förvara SVM-modellerna i
models <- numeric(nsamples)

# Skapa variabel för att hålla reda på hur många Ab som tagits bort
borttagna <- 0

#####
# BEGIN BACKELIM #####
#####

print(Sys.time())

# Kör tills bara två analyser återstår
for(j in 1:(antal-1))
{
  # Check if groups are given in correct order
  control <- as.numeric(svmfac)
  if(sum(control[subset1]) > sum(control[subset2]))
  {
    print("ERROR: Change order of your group1 and group2!!!")
    break
  }
}

【 0 2 2 2 】

```

10

20

30

【表 2 5】

```
# För varje signaturlängd, där alla är med från början, träna en modell för
# varje N-1 kombiantion av prover med den data som finns i elimData
for (i in 1:nsamples)
{
  # Modellerna sparas i en array av listor kallad models
  models[i] <- list(svm(t(t(elimData[,-i]), svmfac[-i], kernel="linear"))
}

# Nu är alla modeller som behövs för LOO tränade och ska testas på elimData.
# I elimData sätts först en analyt till medelvärde, sen testas var och en av
# modellerna med det prov som var borttaget när den tränades.
# När alla modellerna är testade en gång beräknas KL-fel som sparas i errors.
# Nu sätts nästa analyt till medelvärde och testprocessen görs om, tills alla
# analyter varit medelvärdeseleminerade en gång. Resultatet blir en KL-fel
# lista lika lång som antalet analyter som är kvar i datasetet.

# Skapa en lista med K-L fel en viss signaturlängd (antal + 1 - j lång)
# där areorna för varje körning där en Ab i taget har satts till medelvärde
errors <- testModels(models, elimData, averages)

# Lägg namnet på Ab med sämst inverkan på felet i abOrder
abOrder[j] <- getWorstAb(errors, row.names(elimData))

# Lägger till värdet på det minsta felet
smallestErrorPerLength[j] <- getSmallestError(errors)

# Tar bort sämsta Ab ur medelvärdeslistan
averages <- getNewAverages(errors, averages)

# Tar bort sämsta Ab ur elimData
elimData <- getNewElimData(errors, elimData)

# Noterar att en Ab tagits bort
borttagna <- borttagna + 1

# Ange hur många analyter som eliminerats, samt vad klockan är.
print(paste(j, "analytes eliminated @", Sys.time(), sep=""))
}

# Lägg till namnet på sista analyten, som aldrig blen eliminerad
abOrder[length(abOrder)] <- setdiff(ProteinNames, abOrder)
```

10

20

30

【0 2 2 3】

3. スクリプト 1 及び 2 によって読み出される様々な R 機能

【0 2 2 4】

【表 2 6】

```
# getWorstAb: Rapporterar namnet på antikroppen som kommer tas bort
# (den där ROC-arean var som störst)
getWorstAb <- function(errors, abNames)
{
  return(abNames[order(errors, decreasing = F)[1]])
}
```

40

```
# testModels: testar alla modeller som finns i 'models' med alla
# analyser satta till medelvärde en gång
```

【0 2 2 5】

【 表 2 7 】

```

testModels <- function(models, elimData, averages)
{
  nsamples <- ncol(elimData)
  d <- as.numeric(svmfac)-1
  y <- numeric(nsamples)
  E <- numeric(nsamples)
  analytes <- nrow(elimData)
  errors <- numeric(nrow(elimData))

  for(k in 1:analytes)
  {
    # Sätt analyt k till medelvärde i elimData
    # Men spara först analytens originalvärde
    backup <- elimData[k,]
    elimData[k,] <- averages[k]

    # Gör LOO loop för datasetet med de redan färdiga modellerna
    for (i in 1:nsamples)
    {
      pred <- predict(models[[i]] , t(elimData[,i]), decision.values=TRUE)
      #spara decision values
      y[i] <- as.numeric(attributes(pred)$decision.values)
    }

    # Beräkna "sannolikheterna"
    y = 1-(1/(1 + exp(-y)))

    # Beräkna KL-fel när aktuell analyt är eliminerad
    for (i in 1:nsamples)
    {
      E[i] <- -(d[i]*log(y[i])+(1-d[i])*log(1-y[i]))
    }

    # Spara felet
    errors[k] <- sum(E)

    # Lägg tillbaka analyten
    elimData[k,] <- backup
  }
  return( errors )
}

# getNewElimData: Väljer vilken antikropp som ska tas bort ur träningsdatan och tar bort den
getNewElimData <- function(errors, elimData)
{
  # Positionen för det minsta felet
  tasBort <- order(errors,decreasing = F)[1]
  return(elimData[-tasBort,])
}

# getSmallestError: Rapporterar minsta K-L felet
getSmallestError <- function(errors)
{
  return(min(errors))
}

```

10

20

30

【 0 2 2 6 】

【表 2 8】

```
# getNewAverages: skapar en ny lista med medelvärden efter att en analyt
# eliminerats.
getNewAverages <- function(errors, averages)
{
  # Positionen för det minsta felet
  tasBort <- order(errors, decreasing = F)[1]
  return(averages[-tasBort])
}
```

```
# getRemovedAb: tar fram ID på analyt som eliminerats
getRemovedAb <- function(errors, abNames)
{
  return(abNames[order(errors, decreasing = T)[1]])
}
```

10

```
NBtrainer <- function(data, fac){
  MeanVariancePval <- function(vec , fac){
    vec1 <- vec[fac==levels(fac)[1]]
    vec2 <- vec[fac==levels(fac)[2]]
    if (sum(!is.na(vec1))<=2 | sum(!is.na(vec2))<=2){
      return(c(NA,NA,NA,NA,NA))
    }
    mean1 <- mean(vec1 , na.rm=TRUE)
    var1 <- var(vec1 , na.rm=TRUE)
    mean2 <- mean(vec2 , na.rm=TRUE)
    var2 <- var(vec2 , na.rm=TRUE)
    if (var1==0 | var2==0){return(c(NA,NA,NA,NA,NA))}
    pval <- t.test(vec1,vec2,var.equal=TRUE)$p.value
    return(c(mean1,var1,mean2,var2,pval))
  }
  return(t(apply(data , 1 , MeanVariancePval , fac)))
}
```

20

```
NBpredicter <- function(testdata , NBtrained , topnumber=Inf , logfoldcut=0 , pcut =1){
  if (topnumber==Inf){
    indices <- !is.na(NBtrained[,5]) & NBtrained[,5]<=pcut & abs(NBtrained[,1]-
    NBtrained[,3])>=logfoldcut
  }else{
    preindices <- !is.na(NBtrained[,5]) & NBtrained[,5]<=pcut
    abs(NBtrained[preindices,1]-NBtrained[preindices,3]) -> foldchange
    cutfold <- sort(foldchange , decreasing=TRUE )[min(topnumber,length(foldchange))]
    indices <- preindices & (abs(NBtrained[,1]-NBtrained[,3]) >= cutfold)
  }
  NBtrainedred <- matrix(NBtrained[indices,],ncol=ncol(NBtrained))
  testdatared <- matrix(testdata[indices,], ncol=ncol(testdata))
  singlegene <- function( genepred){
    l1 <- -((genepred[6] - genepred[1])^2)/(2*genepred[2])-0.5*log(2*pi*genepred[2])
    l2 <- -((genepred[6] - genepred[3])^2)/(2*genepred[4])-0.5*log(2*pi*genepred[4])
    #print(genepred)
    return(l1-l2)
  }
  NBvectorpredicter <- function(vec){
    combined <- cbind(NBtrainedred , vec)
    combined <- matrix(combined[!is.na(vec),], ncol=6)
    return(sum(apply( combined , 1 , singlegene)))
  }
  return(apply(testdatared , 2 , NBvectorpredicter))
}
```

30

【 0 2 2 7 】

【表 2 9】

```

}

myROC <- function(numbers , fac){
  n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
  n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
  wilcoxresult <- wilcox.test(numbers~fac , alternative="greater")
  ROCarea <- as.numeric(wilcoxresult$statistic)/(n1*n2)
  pval <- wilcoxresult$p.value
  return(c(ROCarea,pval))
}

SensitivitySpecificity <- function(numbers, fac){
  n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
  n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
  un <- sort(unique(numbers), decreasing=TRUE)
  SenSpe <- function(x){
    sen <- sum(numbers>=x & fac==levels(fac)[1])/n1
    spe <- 1 - sum(numbers>=x & fac==levels(fac)[2])/n2
    return(list(Sensitivity=sen,Specificity=spe))
  }
  return(t(sapply(un , SenSpe)))
}

NBlooppreparer <- function(data , fac){
  nsamples <- ncol(data)
  ngenes <- nrow(data)
  NBtrainedarray <- array(NA , dim=c(ngenes,5,nsamples))
  for (i in 1:nsamples){ print(i)
    NBtrainedarray[,i] <- NBtrainer(matrix(data[,i],ncol=nsamples-1),fac[-i])
  }
  return(NBtrainedarray)
}

NBleaveoneout <- function(NBtrainedarray , data , fac , topnumber=Inf , logfoldcut=0 ,
pcut=1){
  nsamples <- ncol(data)
  loglikelihoods <- rep(NA , nsamples)
  for (i in 1:nsamples){
    loglikelihoods[i]<-
NBpredictor(matrix(data[,i],ncol=1),NBtrainedarray[,i],topnumber,logfoldcut,pcut)
  }
  return(loglikelihoods)
}

NBloocv <- function(NBtrainedarray , data , fac , topnumber=Inf , logfoldcut=0 , pcut=1){
  n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
  n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
  SampleInformation <- paste(levels(fac)[1], " ",n1," ", ",levels(fac)[2], " ",n2,sep="")
  loglikelihoods <- NBleaveoneout(NBtrainedarray , data,fac,topnumber,logfoldcut,pcut)
  names <- colnames(data , do.NULL=FALSE)
  orden <- order(loglikelihoods , decreasing=TRUE)
  Samples <- data.frame(names[orden],loglikelihoods[orden],fac[orden])
  ROCdata <- myROC(loglikelihoods,fac)
  SenSpe <- SensitivitySpecificity(loglikelihoods,fac)

  return(list(SampleInformation=SampleInformation,ROCarea=ROCdata[1],p.value=ROCdata[2]
],
          topnumber=topnumber,pcut=pcut,SenSpe <- SenSpe,samples=Samples))
}

```

【 0 2 2 8 】

【表 3 0】

```

NBtwooutpreparer <- function(data , fac){
  nsamples <- ncol(data)
  ngenes <- nrow(data)
  NBdoublearray <- array(NA , dim=c(ngenes,5,nsamples*(nsamples-1)/2))
  for (i in 2:nsamples){
    for (j in 1:(i-1)){ print(paste(i," ",j));
      NBdoublearray[,,(i-1)*(i-2)/2+j] <- NBtrainer(matrix(data[,~c(i,j)],ncol=nsamples-2),fac[-c(i,j)])
    }
  }
  return(NBdoublearray)
}

```

```

NBmaximizer <- function(NBtrainedarray , data , fac){
  functomaximize <- function(pcut , topnumber){
    NBloocv(NBtrainedarray , data , fac , topnumber=top , pcut=pcut)$ROCarea
  }
  rocmax <- 0
  pcutmax <- numeric(0)
  topmax <- numeric(0)
  pcutset <- c(1,0.05,0.01,0.005,0.001, 0.0003 , 0.0005,0.0001)
  topset <- c(1,2,5,10,20,50,100)
  for (pcut in pcutset){
    for (top in topset){
      currentroc <- functomaximize(pcut,top); # print(paste(pcut," ",top," ",currentroc))
      if (currentroc >= rocmax){
        rocmax <- currentroc
        pcutmax <- pcut
        topmax <- top
      }
    }
  }
  print(paste("Result ",pcutmax," ",topmax," ",rocmax))
  return(c(pcutmax,topmax))
}

```

10

20

```

NBtotalvalidation <- function(NBdoublearray , NBtrainedarray , data ,fac){
  n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
  n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
  nsamples <- n1+n2
  ngenes <- nrow(data)
  SampleInformation <- paste(levels(fac)[1]," ",n1," ",levels(fac)[2]," ",n2,sep="")
  maxarray <- matrix(NA , nrow=nsamples , ncol=2)
  colnames(maxarray) <- c("pcut","topnumber")
  NormScore <- numeric(nsamples)
  loglikelihoods <-numeric(nsamples)
  for (i in 1:nsamples){
    NBtemptrainedarray <- array(NA , dim=c(ngenes,5,nsamples-1))
    if (i > 1){
      for (j in 1:(i-1)){
        NBtemptrainedarray[,,j] <- NBdoublearray[,,(i-1)*(i-2)/2+j]
      }
    }
    if (i < nsamples){
      for (j in (i+1):nsamples){
        NBtemptrainedarray[,,j-1] <- NBdoublearray[,,(j-1)*(j-2)/2+i]
      }
    }
    maxarray[i,] <- NBmaximizer( NBtemptrainedarray , data[,~i] , fac[-i])
    temploglikelihoods <- NBpredictor( data, NBtrainedarray[,i] , pcut = maxarray[i,1] ,
    topnumber=maxarray[i,2])
  }
}

```

30

【 0 2 2 9 】

【表 3 1】

```

loglikelihoods[i] <- temploglikelihoods[i]
meanll <- mean(temploglikelihoods[-i])
sdll <- sd(temploglikelihoods[-i])
NormScore[i] <- (temploglikelihoods[i] - meanll)/sdll
}
names <- colnames(data , do.NULL=FALSE)
orden <- order( NormScore , decreasing=TRUE)
Samples <- data.frame(names[orden],NormScore[orden],loglikelihoods[orden],fac[orden]
,maxarray[orden,])
ROCdata <- myROC(NormScore,fac)
SenSpe <- SensitivitySpecificity(NormScore,fac)

return(list(SampleInformation=SampleInformation,ROCarea=ROCdata[1],p.value=ROCdata[2]
),
,SenSpe <- SenSpe,samples=Samples))
}

ROCplot <- function(clasRes , sensspecnumber=6){
Sensitivity <- as.numeric(clasRes[[sensspecnumber]][,1])
Specificity <- as.numeric(clasRes[[sensspecnumber]][,2])
OneMinusSpecificity <- 1- Specificity
ROCarea <- round(clasRes$ROC,digits=2)
plot(OneMinusSpecificity , Sensitivity , type="l" , xlab="1-specificity" , ylab="sensitivity")
title(paste("ROC area = ",ROCarea),font.main=1)
}

ROCplotReverse <- function(clasRes){
Sensitivity <- rev(as.numeric(clasRes[[4]][,2]))
Specificity <- rev(as.numeric(clasRes[[4]][,1]))
OneMinusSpecificity <- 1- Specificity
ROCarea <- round(clasRes$ROC,digits=2)
plot(OneMinusSpecificity , Sensitivity , type="l" , xlab="1-specificity" , ylab="sensitivity")
title(paste("ROC area = ",ROCarea),font.main=1)
}

```

10

20

【 0 2 3 0】

4. 訓練データ、試験データ、及び予測シグネチャーのファイル例

【 0 2 3 1】

【表 3 2】

4. 1. 訓練データ。この表を `tab delimited. txt-file` として保存すべきである。

試料	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	試料 9	試料 10
試料クラ ス	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
予測子 1	1 0	7	4	1 0	4	4	6	1	9	1
予測子 2	5	9	2	6	2	9	3	5	4	1 0
予測子 3	8	3	9	1	9	2	5	1	6	3
予測子 4	4	8	7	7	5	6	8	2	2	3
予測子 5	9	2	2	6	3	4	7	8	9	8
予測子 6	5	4	7	1 0	4	2	1	9	1	1 0
予測子 7	6	4	5	5	1 0	1	5	7	1 0	1
予測子 8	5	4	1	1 0	1	6	2	6	8	4
予測子 9	7	1	3	1 0	3	1	2	1 0	2	2
予測子 10	1 0	8	2	8	2	6	3	4	6	1 0

30

40

【 0 2 3 2】

【表 3 3】

4. 2. 試験データ。この表を `tab delimited. txt-file` として保存すべきである。

試料	試料 1 1	試料 1 2	試料 1 3	試料 1 4	試料 1 5	試料 1 6	試料 1 7	試料 1 8	試料 1 9	試料 2 0
試料ク ラス	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
予測子 1	8	3	1 0	7	6	8	4	6	3	3
予測子 2	6	4	8	9	5	9	7	5	3	9
予測子 3	4	1 0	1	8	9	2	2	6	6	2
予測子 4	5	9	1 0	1 0	8	4	4	9	4	1
予測子 5	1	1 0	1	6	1	1 0	1	3	8	5
予測子 6	6	4	1	3	2	5	9	9	1 0	1 0
予測子 7	5	1	3	3	3	5	6	3	3	6
予測子 8	8	2	2	7	2	2	1 0	4	1 0	1 0
予測子 9	4	1 0	8	6	5	1 0	9	9	4	1
予測子 1 0	3	4	8	3	2	3	8	1 0	7	1

10

20

【0 2 3 3】

30

4. 3. 予測シグネチャー。この表を `tab delimited. txt-file` として保存すべきである。

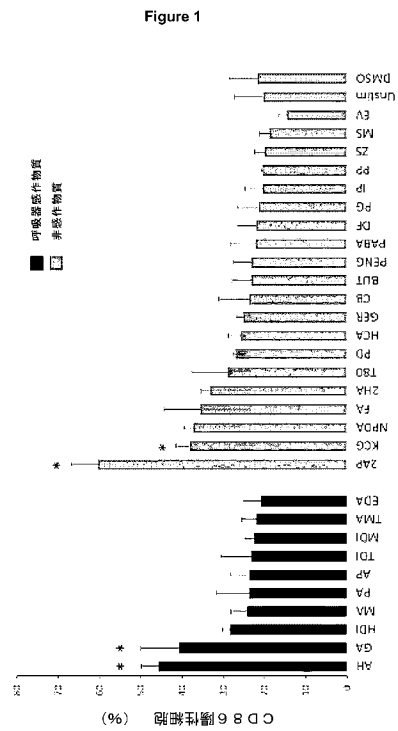
【0 2 3 4】

【表 3 4】

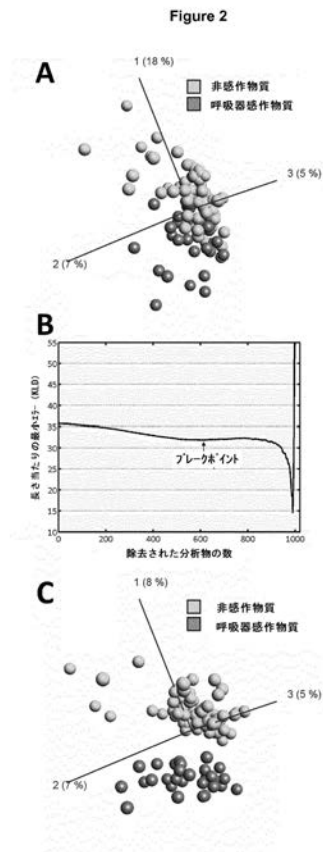
予測子 3
予測子 5
予測子 9

40

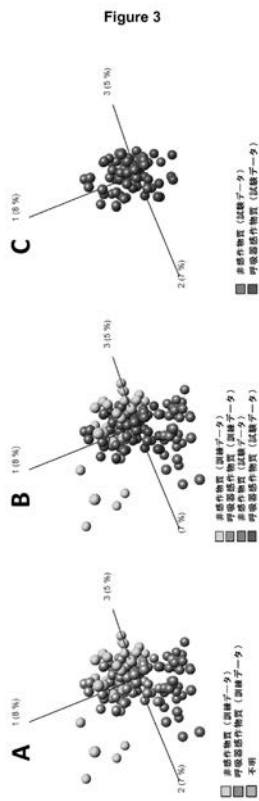
【 図 1 】



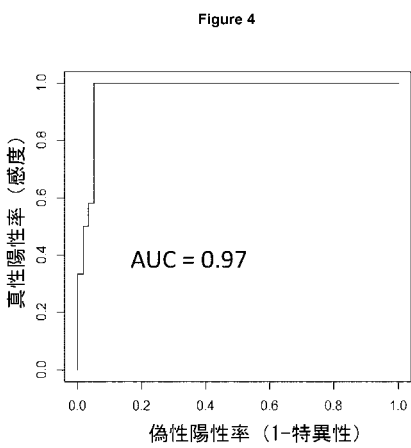
【 図 2 】



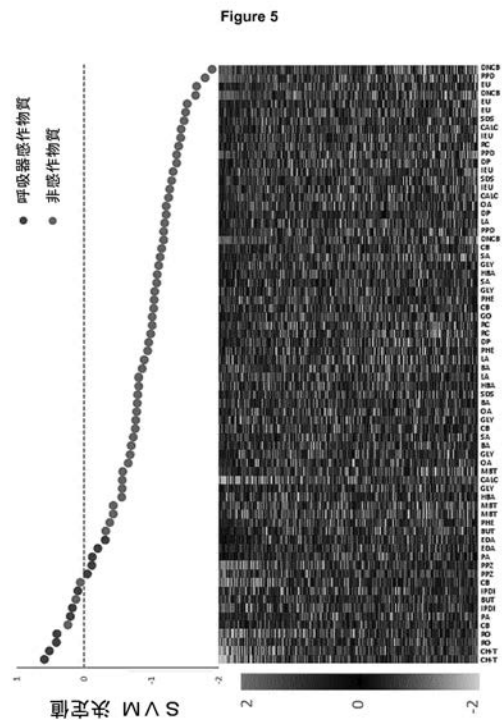
【 図 3 】



【 図 4 】



【図 5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2015/077969**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:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.:

5(completely); 1-4, 8, 13-81(partially)

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

International application No

PCT/EP2015/077969

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/50 C12Q1/68
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/160882 A1 (SENZAGEN AB [SE]) 31 October 2013 (2013-10-31) Whole document, in particular claims -----	1-5,8, 13-81
X	VERSTRAELEN S ET AL: "Gene profiles of THP-1 macrophages after in vitro exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: Identification of discriminating genetic markers and pathway analysis", TOXICOLOGY IN VITRO, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 23, no. 6, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 1151-1162, XP026437429, ISSN: 0887-2333 [retrieved on 2009-06-13] whole document, in particular abstract and materials and methods ----- -/-	1-5,8, 13-81

☒ 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

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 February 2016

Date of mailing of the international search report

09/05/2016

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Vanmontfort, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/077969

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/056236 A2 (SENZAGEN AB [SE]; SMITH STEPHEN EDWARD [GB]; LINDSTEDT MALIN [SE]; BOR) 3 May 2012 (2012-05-03) cited in the application whole document	44-46, 62-67, 72-75
X	----- HENRIK JOHANSSON ET AL: "A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests", BMC GENOMICS, vol. 12, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), page 399, XP055018936, ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/1471-2164-12-399 cited in the application whole document, in particular page 15, right column, paragraph 3	44-46, 62-67, 72-75
X	----- WO 2012/172370 A1 (ELECTROPHORETICS LTD [GB]; SCHOFIELD EMMA [GB]; JUNG STEPHAN [DE]; BUD) 20 December 2012 (2012-12-20) whole document, in particular abstract, claims	1-5,8, 13-43, 47-61, 68-71, 76-81
A	----- Costanza Rovida ET AL: "Advanced Tests for Skin and Respiratory Sensitization Assessment Summary Report on the Sens-it-iv end Congress in Brussels, November 23-25, 2011", ALTEX, 23 November 2011 (2011-11-23), pages 231-252, XP055226299, Retrieved from the Internet: URL: http://altweb.jhsph.edu/altex/30_2/CR_Rovida21.pdf [retrieved on 2015-11-05] page 245, right column, paragraph 1	1-5,8, 13-43, 47-61, 68-71, 76-81
A	----- BOVERHOF ET AL: "Respiratory sensitization and allergy: Current research approaches and needs", TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 226, no. 1, 22 October 2007 (2007-10-22), pages 1-13, XP022386898, ISSN: 0041-008X, DOI: 10.1016/J.TAAP.2007.10.008 Paragraph "in vitro approaches" on pages 6-7	1-5,8, 13-43, 47-61, 68-71, 76-81

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/077969

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013160882 A1	31-10-2013	CA 2871350 A1 CN 104685067 A EP 2841599 A1 KR 20150016523 A US 2015111771 A1 WO 2013160882 A1	31-10-2013 03-06-2015 04-03-2015 12-02-2015 23-04-2015 31-10-2013
WO 2012056236 A2	03-05-2012	CA 2815892 A1 CN 103429756 A EP 2633077 A2 KR 20140001919 A US 2013274134 A1 WO 2012056236 A2	03-05-2012 04-12-2013 04-09-2013 07-01-2014 17-10-2013 03-05-2012
WO 2012172370 A1	20-12-2012	AU 2012270053 A1 CA 2839577 A1 EP 2721409 A1 JP 2014524015 A US 2014220566 A1 WO 2012172370 A1	16-01-2014 20-12-2012 23-04-2014 18-09-2014 07-08-2014 20-12-2012

International Application No. PCT/ EP2015/ 077969

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 5(completely); 1-4, 8, 13-81(partially)

An in vitro method for identifying agents capable of inducing respiratory sensitization in a mammal by exposing dendritic or dendritic-like cells to an agent and determining the expression of a biomarker as indication for the sensitization effect of the agent, an array for use in such methods, use of such a marker, kit comprising an array for identifying such an agent, corresponding computer program and method of treating or preventing respiratory asthma, wherein the invention is characterised in that at least one marker is selected from table A(i) and /or A(ii) and wherein in particular the biomarker is at least TNFRSF19.

2. claims: 6(completely); 1-4, 8, 13-81(partially)

An in vitro method for identifying agents capable of inducing respiratory sensitization in a mammal by exposing dendritic or dendritic-like cells to an agent and determining the expression of a biomarker as indication for the sensitization effect of the agent, an array for use in such methods, use of such a marker, kit comprising an array for identifying such an agent, corresponding computer program and method of treating or preventing respiratory asthma, wherein the invention is characterised in that at least one marker is selected from table A(i) and /or A(ii) and wherein in particular the biomarker is at least SNORA74A.

3. claims: 7(completely); 1-4, 8, 13-81(partially)

An in vitro method for identifying agents capable of inducing respiratory sensitization in a mammal by exposing dendritic or dendritic-like cells to an agent and determining the expression of a biomarker as indication for the sensitization effect of the agent, an array for use in such methods, use of such a marker, kit comprising an array for identifying such an agent, corresponding computer program and method of treating or preventing respiratory asthma, wherein the invention is characterised in that at least one marker is selected from table A(i) and /or A(ii) and wherein in particular the biomarker is at least SPAM1.

4-389. claims: 1-4, 9-81(all partially)

An in vitro method for identifying agents capable of inducing respiratory sensitization in a mammal by exposing dendritic or dendritic-like cells to an agent and

International Application No. PCT/ EP2015/ 077969

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

determining the expression of a biomarker as indication for the sensitization effect of the agent, an array for use in such methods, use of such a marker, kit comprising an array for identifying such an agent, corresponding computer program and method of treating or preventing respiratory asthma, wherein the invention is characterised in that the at least one marker is selected from table A(ii) and/or A(iii), respectively to the order in which they appear in that table.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
<i>G 0 1 N 37/00 (2006.01)</i>	G 0 1 N	37/00	1 0 2	
<i>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</i>	G 0 1 N	33/53	Q	
<i>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</i>	G 0 1 N	33/15	Z	
<i>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</i>	A 6 1 K	45/00		
<i>A 6 1 P 11/00 (2006.01)</i>	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
<i>A 6 1 P 37/08 (2006.01)</i>	A 6 1 P	11/00		
	A 6 1 P	37/08		

(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 ヨアンソン, ヘンリック
スウェーデン王国, 2 1 1 5 8 マルメ, マステル エリックス ブラン 7 ディエ

(72)発明者 アルブレクト, アンソーファー
スウェーデン王国, 2 6 0 2 0 テコマトル, インフォツカタン 7

(72)発明者 フォレリユード, アンドリュウ
スウェーデン王国, 2 1 1 2 8 マルメ, オスタポツゲータン 8 ビーエ

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA77 FB02 FB03
4B029 AA07 BB11 BB20 CC03 FA12
4B063 QA07 QA18 QQ02 QQ08 QQ53 QR08 QR42 QR48 QR55 QS25
QS33 QS34 QS36 QX02 QX07
4C084 AA17 NA05 ZA591 ZA592 ZB131 ZB132 ZC411 ZC412

专利名称(译)	用于分析方法和分析方法的阵列		
公开(公告)号	JP2018505655A	公开(公告)日	2018-03-01
申请号	JP2017528971	申请日	2015-11-27
[标]发明人	リンドスタッド,マリンマルー ボルベック,カール アークア ヨアンソン,ヘンリック アルブレクト,アン-ソフー フォレリユード,アンドリユー		
发明人	リンドスタッド,マリンマルー ボルベック,カール アークア ヨアンソン,ヘンリック アルブレクト,アン-ソフー フォレリユード,アンドリユー		
IPC分类号	C12Q1/68 C12M1/00 C12N15/09 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/15 A61K45/00 A61P43/00 A61P11/00 A61P37/08		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/5023 G01N33/5047 A61P11/00 A61P37/08 A61P43/00 C12Q1/6876 C12Q2600/178 G01N2333/70578 G01N2333/924 G01N2800/12		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12M1/00.A C12N15/00.F G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N33/53.Q G01N33/15.Z A61K45/00 A61P43/00.111 A61P11/00 A61P37/08		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZC411 4C084/ZC412		
优先权	2014021207 2014-11-28 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及鉴定能够在哺乳动物中引起呼吸道致敏的试剂的方法，以及用于这种方法的阵列和诊断试剂盒。具体地，该方法包括测量暴露于测试药物的细胞中表A (i)，表A (ii) 和/或表A (iii) 中所列生物标志物的表达水平。包括。[选型图]图1

