

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-532047

(P2009-532047A)

(43) 公表日 平成21年9月10日(2009.9.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 120 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-503471 (P2009-503471)	(71) 出願人	597011463 ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト スイス国、4056 バーゼル、リヒトシ ュトラーセ 35
(86) (22) 出願日	平成19年4月2日(2007.4.2)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成20年12月2日(2008.12.2)	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/002953	(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(87) 国際公開番号	W02007/112999	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(87) 国際公開日	平成19年10月11日(2007.10.11)	(72) 発明者	アンドレアス・シェーラー ドイツ連邦共和国デー79117フライ ブルク、アレマンネンシュトラーセ73番 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	0606776.3		
(32) 優先日	平成18年4月3日(2006.4.3)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

(54) 【発明の名称】 慢性同種移植腎症についての予測バイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、移植拒絶においてモジュレーションされる遺伝子の分析および同定に関するものである。遺伝子発現のこの変化により、移植拒絶を正確に検出する分子シグネチャーが提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象における移植臓器の拒絶の兆候を予測する方法であって、

(a) 移植後試料を対象から入手し、

(b) PLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組み合わせた表4、表5、表6、表7および表8の遺伝子から成る群から選択される複数遺伝子の組合わせの移植後試料における遺伝子発現レベルを測定し、

(c) 移植後試料における少なくとも1個の遺伝子の遺伝子発現の規模を、対照試料における同遺伝子の遺伝子発現の規模と比較し

(d) 少なくとも1個の遺伝子の発現レベルが対照試料に比べてアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされているか否かを測定し、その結果少なくとも1個の遺伝子がアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされていれば、対象が移植拒絶反応を経験している可能性があるものとし、それにより対象における移植臓器の拒絶反応の兆候を予測する

段階を含む方法。

【請求項 2】

試料が対象から得た細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

試料が、移植片生検材料、血液、血清および尿から成る群から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

拒絶が慢性/硬化性同種移植(allograft)腎症である、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

試料における発現の規模が、対照の発現規模と少なくとも約1.5の係数による差を示す、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

試料における発現の規模が、対照の発現規模と少なくとも約2の係数による差を示す、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

対象における移植臓器の拒絶の兆候を予測する方法であって、

(a) 移植後試料を対象から入手し、

(b) PLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組み合わせた表4、表5、表6、表7および表8の遺伝子から成る群から選択される複数遺伝子の組合わせの移植後試料における遺伝子発現レベルを測定し、

(c) 移植後試料における遺伝子組合わせの遺伝子発現パターンを、対照試料における遺伝子の同組み合わせの遺伝子発現パターンと比較し、移植後試料における遺伝子組合わせの遺伝子発現パターンを対照試料発現プロフィールにおける遺伝子の同組み合わせの発現パターンと比較した場合に発現パターンの類似性が認められれば、対象が移植拒絶を経験している可能性があるものとし、それにより対象における移植臓器の拒絶の兆候を予測する

段階を含む方法。

【請求項 8】

試料が対象から得た細胞を含む、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

試料が、移植片生検材料、血液、血清および尿から成る群から選択される、請求項7記載の方法。

【請求項 10】

拒絶が慢性/硬化性同種移植(allograft)腎症である、請求項7記載の方法。

【請求項 11】

対象における移植拒絶のモニター方法であって、

10

20

30

40

50

(a) 拒絶反応を起こしていないことが判明している移植対象から採取した試料における複数遺伝子の組み合わせの遺伝子発現の規模を基準値とし、

(b) 移植後患者から採取した試料における複数遺伝子の組み合わせに対応する遺伝子発現の規模を検出し、

(c) 第一の値を第二の値と比較する

段階を含み、第一の値が第二の値より低いかまたは高い場合、移植対象が拒絶反応発症の危険をはらんでいることが予測され、上記複数遺伝子が、P L D S A モデルおよびO P L S モデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表 4、表 5、表 6、表 7 および表 8 の遺伝子から成る群から選択されるものである方法。

【請求項 1 2】

対象における移植拒絶のモニター方法であって、

(a) 移植当日にドナー対象から入手した試料からの複数遺伝子の組み合わせに対応する遺伝子発現パターンを検出し、

(b) 移植後のレシピエント対象から得た試料からの複数遺伝子に対応する遺伝子発現パターンを検出し、

(c) 第一の値を第二の値と比較する

段階を含み、第一の値が第二の値より低いかまたは高い場合、レシピエント対象が拒絶反応発症の危険をはらんでいることが予測され、上記複数遺伝子が、P L D S A モデルおよびO P L S モデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表 4、表 5、表 6、表 7 および表 8 の遺伝子から成る群から選択されるものである方法。

【請求項 1 3】

移植拒絶の危険がある対象におけるそのモニター方法であって、

(a) 拒絶阻害剤の投与前に移植対象から投与前試料を入手し、

(b) 投与前試料において複数遺伝子の遺伝子発現の規模を検出し、

(c) 移植対象から 1 つまたはそれ以上の投与後試料を入手し、

投与後の一試料または複数試料における複数遺伝子の遺伝子発現パターンを検出し、

投与前試料における複数遺伝子の遺伝子発現パターンを、投与後の一試料または複数試料における遺伝子発現パターンと比較し、

それに応じて作用物質を調節する

段階を含み、上記複数遺伝子が、P L D S A モデルおよびO P L S モデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表 4、表 5、表 6、表 7 および表 8 の遺伝子から成る群から選択されるものである方法。

【請求項 1 4】

処置を必要とする対象における移植拒絶の予防、阻止、縮小または処置方法であって、P L D S A モデルおよびO P L S モデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表 4、表 5、表 6、表 7 および表 8 の遺伝子から成る群から選択される遺伝子の 1 個またはそれ以上の遺伝子またはそれらによりコード化される遺伝子産物の合成、発現または活性をモジュレーションする化合物を対象に投与することを含み、その結果拒絶反応の少なくとも一つの兆候が改善される方法。

【請求項 1 5】

P L D S A モデルおよびO P L S モデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表 4、表 5、表 6、表 7 および表 8 の遺伝子から成る群から選択される 1 個またはそれ以上の遺伝子または遺伝子産物の遺伝子発現レベルをモニターすることを含む、移植拒絶の予防、阻止、縮小または処置に使用する作用物質の同定方法。

【請求項 1 6】

移植対象が腎臓移植対象である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7】

遺伝子によりコード化されるタンパク質の存在を検出することにより、遺伝子発現パターンを評価する、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8】

10

20

30

40

50

タンパク質に特異的に結合する試薬を用いてタンパク質の存在を検出する、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

ノーザン・ブロット分析、逆転写 P C R および実時間定量的 P C R から成る群から選択される技術により、遺伝子発現パターンを検出する、請求項 12 ~ 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

複数遺伝子の遺伝子発現の規模を検出する、請求項 12 ~ 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

移植拒絶に関するバイオマーカーとしての P L D S A モデルおよび O P L S モデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表 2、表 3 または表 4 に列挙した複数遺伝子またはその発現産物の組合わせの使用。

【請求項 22】

対象における移植拒絶の予防または処置用の医薬の製造を目的とする、P L D S A モデルおよび O P L S モデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表 2、表 3 または表 4 に示した 1 個またはそれ以上の遺伝子またはその発現産物の合成、発現または活性をモジュレーションする化合物の使用。

【請求項 23】

移植拒絶が慢性 / 硬化性同種移植腎症であり、遺伝子が、P L D S A モデルおよび O P L S モデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表 2、表 3 および表 4 に示した遺伝子から成る群から選択される、請求項 1 ~ 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

試料が、血液、血清および尿から成る群から選択される、請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概してインビトロ組織試料の分析試験法、さらに具体的には慢性同種移植腎症の予測に有用な遺伝子またはタンパク質に基づく試験法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

慢性移植片機能不全は、移植後徐々に移植片機能の悪化を示す固体臓器移植片における現象であり、結局は移植片生着不全に至り、特有の組織学的特徴を伴うものである。臨床的には、腎臓移植片における慢性移植片機能不全、例えば慢性 / 硬化性同種移植腎症（「CAN」）は、それ自体、通常タンパク尿および動脈高血圧と共に、糸球体濾過量の緩慢な漸進的下降として症状を表わす。効力のある免疫調節剤および生物製剤を臨床適用しているにもかかわらず、急性拒絶反応は、依然としてよく見られる深刻な移植後合併症である。慢性拒絶は、過酷な進行性の経過をたどる。

【0003】

特に移植後 1 カ月以内における早期移植片生着不全に関する一つの最も一般的な原因は、同種移植片の免疫学的拒絶反応である。拒絶反応の好ましくない影響は、(a) 免疫抑制の維持に付加された、高用量拒絶療法の使用が、移植に関連した病的状態および死亡の主たる原因となっている、(b) 拒絶移植片から生じる「高頻度の(public)」HLA 特異性に対する免疫化により、この患者集団に対する再移植が困難になる、および(c) 移植が失敗した免疫化レシピエントを、移植を待つ患者のプールに戻すことにより、長年続いている臓器不足の問題を助長するという事実により拡大される。

【0004】

生検組織の組織病理学的評価が CAN の診断についての最も信頼できる標準的手段であって、CAN の兆候の予測は現時点では不可能である。現行のモニターおよび診断の様相

10

20

30

40

50

は、初期段階でのCANの診断には不適切である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、遺伝子発現プロファイリングを用いる分子診断方法に関するものであり、BANFF97疾病分類がさらに細かく分類される(Racusen LC, et al., Kidney Int. 55 (2) : 713 - 23 (1999))。本発明はまた、他のさらなる慣用的手段では移植片機能不全がまだ検出され得ない移植後の早期時点で適用される場合の予測的または早期診断バイオマーカーとしてのバイオマーカーの使用方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

したがって、一つの態様として、本発明は、対象における移植臓器の拒絶の兆候の予測方法であって、(a)移植後試料を対象から入手し、(b)PLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組み合わせた表4、表5、表6、表7および表8の遺伝子から成る群から選択される複数遺伝子の組み合わせの移植後試料における遺伝子発現レベルを測定し、(c)移植後試料における少なくとも1個の遺伝子の遺伝子発現の規模を、対照試料における同遺伝子の遺伝子発現の規模と比較し(d)少なくとも1個の遺伝子の発現レベルが対照試料に比べてアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされているか否かを測定し、その結果少なくとも1個の遺伝子がアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされていれば、対象が移植拒絶反応を経験している可能性があるものとし、それにより対象における移植臓器の拒絶反応の兆候を予測する段階を含む方法に関するものである。

【0007】

試料は、対象から入手した細胞を含む。試料は、移植片生検、血液、血清および尿から成る群から選択され得る。拒絶は、慢性/硬化性同種移植腎炎であり得る。試料における発現規模は、対照発現規模と少なくとも約1.5の係数または少なくとも約2の係数による差を示す。

【0008】

別の態様として、本発明は、対象における移植臓器の拒絶の兆候を予測する方法であって、(a)移植後試料を対象から入手し、(b)PLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組み合わせた表4、表5、表6、表7および表8の遺伝子から成る群から選択される複数遺伝子の組み合わせの移植後試料における遺伝子発現レベルを測定し、(c)移植後試料における遺伝子組み合わせの遺伝子発現パターンを、対照試料における遺伝子の同組み合わせの遺伝子発現パターンと比較し、移植後試料における遺伝子組み合わせの遺伝子発現パターンを対照試料発現プロフィールにおける遺伝子の同組み合わせの発現パターンと比較した場合に発現パターンの類似性が認められれば、対象が移植拒絶を経験している可能性があるものとし、それにより対象における移植臓器の拒絶の兆候を予測する段階を含む方法に関するものである。

【0009】

別の態様として、本発明は、対象における移植拒絶のモニター方法であって、(a)拒絶反応を起こしていないことが判明している移植対象から採取した試料における複数遺伝子の組み合わせの遺伝子発現の規模を基準値とし、(b)移植後患者から採取した試料における複数遺伝子の組み合わせに対応する遺伝子発現の規模を検出し、(c)第一の値を第二の値と比較する段階を含み、第一の値が第二の値より低いかまたは高い場合、移植対象が拒絶反応発症の危険をはらんでいることが予測され、上記複数遺伝子が、PLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組み合わせた表4、表5、表6、表7および表8の遺伝子から成る群から選択されるものである方法に関する。

【0010】

別の態様として、本発明は、対象における移植拒絶のモニター方法であって、(a)移植当日にドナー対象から入手した試料からの複数遺伝子の組み合わせに対応する遺伝子発

10

20

30

40

50

現パターンを検出し、(b)移植後のレシピエント対象から得た試料からの複数遺伝子に対応する遺伝子発現パターンを検出し、(c)第一の値を第二の値と比較する段階を含み、第一の値が第二の値より低いかまたは高い場合、レシピエント対象が拒絶反応発症の危険をはらんでいることが予測され、上記複数遺伝子が、PLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表4、表5、表6、表7および表8の遺伝子から成る群から選択されるものである方法に関する。

【0011】

別の態様として、本発明は、移植拒絶の危険がある対象におけるそのモニター方法であって、(a)拒絶阻害剤の投与前に移植対象から投与前試料を入手し、(b)投与前試料において複数遺伝子の遺伝子発現の規模を検出し、(c)移植対象から1つまたはそれ以上の投与後試料を入手し、投与後の一試料または複数試料における複数遺伝子の遺伝子発現パターンを検出し、投与前試料における複数遺伝子の遺伝子発現パターンを、投与後の一試料または複数試料における遺伝子発現パターンと比較し、それに応じて作用物質を調節する段階を含み、上記複数遺伝子が、PLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表4、表5、表6、表7および表8の遺伝子から成る群から選択されるものである方法に関する。

10

【0012】

別の態様として、本発明は、処置を必要とする対象における移植拒絶の予防、阻止、縮小または処置方法であって、PLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表4、表5、表6、表7および表8の遺伝子から成る群から選択される遺伝子の1個またはそれ以上の遺伝子またはそれらによりコード化される遺伝子産物の合成、発現または活性をモジュレーションする化合物を対象に投与することを含み、その結果拒絶反応の少なくとも一つの兆候が改善される方法に関するものである。

20

【0013】

別の態様として、本発明は、PLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表4、表5、表6、表7および表8の遺伝子から成る群から選択される1個またはそれ以上の遺伝子または遺伝子産物の遺伝子発現レベルをモニターすることを含む、移植拒絶の予防、阻止、縮小または処置に使用する作用物質の同定方法に関するものである。

【0014】

移植対象は腎臓移植対象であり得る。遺伝子によりコード化されたタンパク質の存在を検出することにより、遺伝子発現パターンが評価され得る。タンパク質の存在は、タンパク質に特異的に結合する試薬を用いて検出され得る。ノーザン・ブロット分析、逆転写PCRおよび実時間定量的PCRから成る群から選択される技術により、遺伝子発現パターンが検出され得る。一遺伝子または複数遺伝子の遺伝子発現の規模が検出され得る。

30

【0015】

別の態様として、本発明は、移植拒絶に関するバイオマーカーとしてのPLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表2、表3または表4に列挙した複数遺伝子またはその発現産物の組合わせの使用に関するものである。

40

【0016】

別の態様として、本発明は、対象における移植拒絶の予防または処置用の医薬の製造を目的とする、PLDSAモデルおよびOPLSモデルから成る群から選択される予測モデルと組合わせた表2、表3または表4に示した1個またはそれ以上の遺伝子またはその発現産物の合成、発現または活性をモジュレーションする化合物の使用に関するものである。

【0017】

図面の簡単な説明

図1は、組織病理学的評価による安定した同種移植片機能(正常、N)および慢性同種移植片拒絶(CAN)の診断に関する生検試料の時間推移の詳細を示した概要図である；

50

図 2 は、バイオマーカー 0 6 週で得られたバイオマーカーデータの部分最小二乗法判別分析 (P L D A) により得られた散布図である ;

図 3 は、実測対予測バイオマーカーデータを比較するバイオマーカー 0 6 週で得られたデータの P L S D A により得られたグラフである ;

図 4 は、バイオマーカー 0 6 週 P L S D A モデル : Validation by Response Permutation (応答並べ替えによるバリデーション) に関するバイオマーカーデータのグラフである ;

【 0 0 1 8 】

図 5 は、バイオマーカー 1 2 週で得られたバイオマーカーデータの直交部分最小二乗法分析 (O P L S) により得られた散布図である ;

図 6 は、バイオマーカー 1 2 週 O P L S モデル : 「 応答並べ替えによるバリデーション 」 に関するバイオマーカーデータのグラフである ;

図 7 は、実測対予測バイオマーカーデータを比較するバイオマーカー 1 2 週 で得られたデータの O P L S により得られたグラフである ;

図 8 は、バイオマーカー 0 6 週 で得られたバイオマーカーデータの P L D A により得られた散布図である ;

図 9 は、バイオマーカー 1 2 週 P L S D A モデル : 「 応答並べ替えによるバリデーション 」 に関するバイオマーカーデータのグラフである ;

図 1 0 は、実測対予測バイオマーカーデータを比較するバイオマーカー 1 2 週 で得られたデータの O P L S により得られたグラフである ;

図 1 1 は、バイオマーカーデータのグローバル分析における直交シグナル補正 (O S C) により得られた散布図である ;

【 0 0 1 9 】

図 1 2 は、バイオマーカーグローバル分析 O S C モデル : 「 応答並べ替えによるバリデーション 」 に関するバイオマーカーデータのグラフである ;

図 1 3 は、実測対予測バイオマーカーデータを比較するデータのグローバル分析 O S C モデリングにより得られたグラフである ;

図 1 4 は、バイオマーカーデータのグローバル分析における O P L S により得られた散布図であり、

図 1 5 は、実測対予測バイオマーカーデータを比較するデータのグローバル分析 O P L S モデリングにより得られたグラフである ;

図 1 6 は、C A N の臨床 / 組織病理学的徴候が明らかになる 4 . 5 か月前、T X 後 6 週目の時点を示すチャートである。

図 1 7 は、6 週目 (C A N の 4 . 5 か月前) でのバイオマーカー同定のグラフである。患者群が明確に分離されている (4 9 プロブセットによる P L S D A モデル) 。

【 0 0 2 0 】

図 1 8 は、6 週目 (C A N の 4 . 5 か月前) でのクロス-バリデーションを示すグラフである。クロス-バリデーション (「 7 試料のうち 1 群抜き 」) : モデルは N と前 C A N を明確に分離する。

図 1 9 は、C A N の臨床 / 組織病理学的徴候が明らかになる 3 か月前、T X 後 6 週目の時点を示すチャートである。

図 2 0 は、6 週目 (t 検定 < 0 . 0 5 、 1 . 2 F C) および 1 2 週目 (t 検定 < 0 . 0 5 、 1 . 5 F C) で同定されたバイオマーカーのオーバーラップを示すチャートである。0 6 週目および 1 2 週目の生物学的遺伝子リスト間における小さなオーバーラップは、特定時点での異なる根元的生物学的プロセス / 経路の存在を示し得る。

図 2 1 は、2 0 1 プロブセットによる O S C モデルの図である。2 0 1 プロブセットによる O S C モデルは、時点および診断により群を区別する。

図 2 2 は、経路分析および生物学的機構を示す図である。異なる時点での経路の一時的活性化。

図 2 3 は、並び替えによるモデルバリデーションを示す図である。並び替え分析による

10

20

30

40

50

モデルバリデーション：100回繰り返し（すなわち、「リアルモデル」の適合度と比べた100PLSモデルの適合度）。

【0021】

定義

本発明をさらに理解しやすくするため、若干の語および句を以下に定義する：

「ダウンレギュレーション」または「ダウンレギュレーションされた」の語については、本明細書では互換的に使用しており、標的遺伝子または標的タンパク質の量の減少をいう。「ダウンレギュレーション」または「ダウンレギュレーションされた」の語はまた、標的遺伝子または標的タンパク質を伴うプロセスまたはシグナル伝達カスケードの減少をいう。

10

【0022】

本明細書で使用している「移植」の語は、一対象から「移植体」または「移植片」と呼ばれる細胞、組織または臓器を取り出し、それまたはそれらを（通常は）異なる対象に植え付ける過程をいう。移植体を提供する対象を「ドナー」と呼び、移植体を受け入れる対象を「レシピエント」という。同種の遺伝的に異なる2対象間で移植された臓器または移植片を、「同種移植片」と呼ぶ。種が異なる対象間で移植された移植体を「異種移植片」と呼ぶ。

【0023】

本明細書で使用している「移植拒絶（反応）」の語は、レシピエントが発する活性免疫応答に起因し、臓器機能不全の非免疫学的原因とは関係の無い臓器の機能的および構造的悪化として定義される。

20

【0024】

本明細書で使用している「慢性拒絶（反応）」の語は、移植臓器（例、腎臓）の拒絶反応をいう。この語は、移植片機能の喪失に至る過程および移植後の最初の30～120日経過後に現れる後発性移植片（機能）喪失に適用される。腎臓では、腎臓脈管の血管内膜の増殖および内膜繊維増多を伴い、管腔の著しい減少を伴う腎硬化症（腎臓血管の硬化）の発生が認められる。その結果が、腎臓虚血、高血圧、尿細管萎縮、間質性繊維症および糸球体萎縮であり、結果的に腎不全となる。確立されたHLA不適合性の影響に加えて、ドナー腎臓の年齢、ネフロン数および虚血歴が、移植患者における最終的な進行性腎不全の誘因となり得る。

30

【0025】

本明細書で使用している「対象」の語は、免疫応答が発せられる生物体をいう。対象の語は、ヒト、ヒト以外の霊長類、例えばチンパンジーおよび他の類人猿および尾の長いサル種、家畜、例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ、家で飼われる哺乳類、例えばイヌおよびネコ、マウス、ラットおよびモルモットなどのげっ歯動物を含む実験動物などを含むが、これらに限定するわけではない。この語は、特定の年齢または性別を示さない。したがって、成体および新生児対象、および胎児が、雄性であろうと雌性であろうと包含されるものとする。

【0026】

「遺伝子」は、転写および翻訳された後特定ポリペプチドまたはタンパク質をコード化し得る少なくとも1個の読み枠を含むポリヌクレオチドを含む。本明細書記載のポリヌクレオチド配列のいずれかを用いることにより、それらが会合している遺伝子の大きなフラグメントまたは完全長コーディング配列が同定され得る。大きなフラグメント配列の単離方法は、当業者には公知であり、それらのうちのいくつかを本明細書に記載している。

40

【0027】

「遺伝子産物」は、遺伝子が転写および翻訳されたときに生成されるアミノ酸（例、ペプチドまたはポリペプチド）を含む。

【0028】

本明細書で使用している「発現の規模」の語は、マーカー遺伝子転写物を定量し、この量を構成的に発現された遺伝子の転写物の量と比較する場合に用いる。「発現の規模」の

50

語は、「遺伝子発現の正規化または標準化された量」をいう。例えば、細胞における全遺伝子の全体的発現は変動する（すなわち、一定していない）。増加したmRNA転写物の検出が有意であるか否かを正確に評価するためには、遺伝子発現を「正規化」することにより、試料間で発現レベルを正確に比較することが好ましい、すなわちそれが遺伝子発現を比較する場合の基準レベルとなる。一具体例では、発現された遺伝子は、wnt経路（例、NFAT、NE-dlg、frizzled-9、hes-1）、TGFベータ（例、NOMO、SnON）、グルコースおよび脂肪酸輸送および代謝（例、GLUT4）、血管平滑筋分化（例、アムニオンレス、ACLP、ルミカン）、血管硬化（例、THRA、IGFBP4）、ECM（例、コラーゲン）、および免疫応答（例、TNF、NFAT、GM-CSF）から成る群から選択される生物学的経路/過程と関連している。競合的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を用いて遺伝子転写物の定量化を実施し、発現された遺伝子の遺伝子発現量に対する各マーカー遺伝子の遺伝子発現の量の比を計算することにより、遺伝子発現の規模を測定した。

10

20

30

40

50

【0029】

遺伝子に適用されている場合の「示差的に発現された」の語は、遺伝子または遺伝子によりコード化されたタンパク質産物から転写されたmRNAの有意差を示す産物を含む。示差的に発現された遺伝子は、正常または対照細胞の発現レベルと比べて過剰発現または過少発現され得る。一態様において、これは、対照試料で検出された発現レベルよりも少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍または少なくとも10倍の割合で高いか低い差を含む。好ましい実施態様では、発現レベルは対照試料より高い。また、「示差的に発現された」の語は、対照細胞で検出できない場合に発現されているかまたは対照細胞で発現される場合に発現されない細胞または組織でのヌクレオチド配列についても包含する。特に、この語は、所与の同種移植片遺伝子発現レベルをいい、対応する基準発現レベルの量より実質的に多いかまたは少ない量として定義される。基準は、健康な組織における発現レベルとして定義される。健康な組織は、病理学的所見を伴わない移植臓器を含む。

【0030】

本明細書で使用している「試料」の語は、生検材料から得られる細胞をいう。「試料」の語はまた、流体試料、例えば、限定するわけではないが、気管支肺胞洗浄液の試料、胆汁、胸膜液または腹膜液の試料、または機能が正常または異常な状態である同種移植片により分泌または排泄される他の流体、または同種移植片を通して、または同種移植片の解剖学的近位での滲出または濾出から生じる他の流体、または同種移植片との液体連通における流体から得られる細胞をいう。また、流体試験試料は、血液（末梢血を含む）、リンパ液、汗、腹膜液、胸膜液、気管支肺胞洗浄液、心膜液、胃腸液、胆汁、尿、糞便、組織液または腫脹液、関節液、脳脊髄液、または同種移植片の近位にある解剖学的領域から集められるか、または同種移植片との流体連通における（流体）導管から集められる他の特定または不特定の流体を含め、本質的にいかなる体液からでも入手され得る。「移植後流体試験試料」は、移植が行われた後に対象から得られる試料をいう。

【0031】

また、一連の試料を対象から採取し、本明細書記載の要領で免疫活性化遺伝子マーカーの定量化を実施し、拒絶反応の経過を一定期間にわたって追跡し得る。この場合、例えば、バイオマーカー遺伝子（複数も可）の遺伝子発現の基準規模は、移植後採取した移植後試料における遺伝子発現の規模である。例えば、最初の一試料または複数試料を、非拒絶期間内、例えば移植の1週間以内に採取し、これらの試料におけるバイオマーカー遺伝子の発現規模を、1週間後に採取した試料における遺伝子の発現規模と比較し得る。一実施態様では、試料を移植後6、12および24週間目に採取する。

【0032】

本明細書で使用している「生検材料」の語は、検診用に生きている患者から組織を取り出すことにより得られる標本をいう。この語は、吸引生検、ブラシ生検、絨毛採取生検、

内視鏡生検、切除生検、針生検（皮膚または臓器の外表面を穿刺して、検査すべき深層組織へ到達させるのに適切な針またはトロカールを通した吸引による摘出により得られる標本）、直視下生検、パンチ生検（トレフィン）、薄片生検、擦過生検、および楔状生検を包含する。一実施態様では、穿刺吸引生検を使用する。別の実施態様では、ミニコア針生検を使用する。慣用的経皮コア針生検材料も使用され得る。

【0033】

「アップレギュレーション」または「アップレギュレーションされた」の語については、本明細書では互換的に使用しており、標的遺伝子または標的タンパク質の量の増加または上昇をいう。「アップレギュレーション」または「アップレギュレーションされた」の語はまた、標的遺伝子または標的タンパク質を伴うプロセスまたはシグナル伝達カスケードの増加または上昇をいう。

10

【0034】

本明細書で使用している「遺伝子クラスター」または「クラスター」の語は、発現パターンに関連性が見られる一群の遺伝子をいう。言い換えれば、遺伝子のクラスターは、例えば移植片非拒絶移植片拒絶といった異なる条件の場合でも、全般的に類似したレギュレーションを示す一群の遺伝子である。一クラスターにおける各遺伝子に関する発現プロフィールは、当然そのクラスターにおける他の少なくとも1個の遺伝子の発現プロフィールと相関関係を示す。相関関係は、様々な統計的方法を用いて評価され得る。必ずではないが、多くの場合、一遺伝子クラスターの構成員は、類似した遺伝子発現パターンに加えて類似した生物学的機能を有する。

20

【0035】

本明細書で使用している「プローブセット」は、2個またはそれ以上の遺伝子を検出するのに使用され得る核酸の一群をいう。検出は、例えば、PCRおよびRT-PCRでの増幅、または例えばマイクロアレイでのハイブリダイゼーション、または例えば1本または2本鎖核酸の選択的酵素分解に基づく検定法における選択的破壊および保護を通して行われ得る。プローブセットにおけるプローブは、1つまたはそれ以上の蛍光性、放射性または他の検出可能な部分（酵素を含む）により標識され得る。目的遺伝子を選択的に検出するのに十分な大きさのプローブであれば、いかなるサイズのプローブでもよい。プローブセットは、マルチプレックスPCRの場合に典型的であるように溶解状態であり得るか、またはプローブセットは、アレイまたはマイクロアレイの場合のように固体表面に附着され得る。PNAなどの化合物が、核酸の代わりに遺伝子とのハイブリダイゼーションに使用され得ることは公知である。さらに、プローブは、希少または非天然核酸、例えばイノシンを含み得る。

30

【0036】

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」の語は互換的に使用され、あらゆる長さのヌクレオチドのポリマー形態、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、またはその類似体を包含する。ポリヌクレオチドは、三次元構造を有し得、既知または未知の機能を遂行し得る。以下のものはポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列を有する単離DNA、任意の配列を有する単離RNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体を含み得る。存在するとすれば、ヌクレオチド構造に加えられる修飾は、ポリマー集合の前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断され得る。ポリヌクレオチドは、さらに重合後に、例えば標識成分で標識することにより修飾され得る。またこの語は、2本および1本鎖分子の両方を含む。特記または要求されなければ、ポリヌクレオチドである本発明の実施態様は全て、2本鎖形態および2本鎖形態を構成することが既知であるかまたは予測される2本の相補的1本鎖形態の各々を共に包含する。

40

【0037】

50

ポリヌクレオチドは、4種のヌクレオチド塩基の特定配列により構成される：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）、およびポリヌクレオチドがRNAである場合はグアニンの代わりにウラシル（U）。この「ポリヌクレオチド配列」の語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示は、中央処理装置を有するコンピューターにおけるデータベースに入力され、バイオインフォマティクス適用、例えば機能ゲノム学および相同性検索に使用され得る。

【0038】

「cDNA」の語は、相補的DNA、すなわち酵素、例えば逆転写酵素でcDNAに合成される細胞または生物体に存在するmRNA分子を含む。「cDNAライブラリー」は、酵素、すなわち逆転写酵素によりcDNA分子に変換され、次いで「ベクター」（外来DNAの付加後に複製し続け得る他のDNA分子）に挿入される、細胞または生物体に存在するmRNA分子の集合体を含む。ライブラリーに関するベクターの例には、バクテリオファージ、細菌に感染するウイルス（例、ラムダファージ）がある。また、ライブラリーは、興味の対象である特異的cDNA（すなわちmRNAも）について探査され得る。

10

【0039】

「プライマー」は、標的とハイブリダイゼーションすることにより興味の対象である試料に存在する標的または「鋳型」に結合する遊離3'-OH基を一般的に伴い、そのハイブリダイゼーション後、標的に相補的なポリヌクレオチドの重合を促進する短いポリヌクレオチドを含む。「ポリメラーゼ連鎖反応」（「PCR」）は、「上流」および「下流」プライマーから成る「プライマー対」または「プライマーのセット」、および重合の触媒、例えばDNAポリメラーゼ、および典型的には熱安定性ポリメラーゼ酵素を用いて標的ポリヌクレオチドから複製コピーを作成する反応である。PCR方法は当業界では公知であり、例えば MacPherson et al., IRL Press, Oxford University Press (1991) に示されている。PCRまたは遺伝子クローニングなどのポリヌクレオチドの複製コピーの生成過程は全て、本明細書ではまとめて「複製」と称す。プライマーはまた、ハイブリダイゼーション反応、例えばサザンまたはノーザン・プロット分析におけるプローブとして使用され得る（例、Sambrook, J., Fritsch, E.F. および Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、1989参照）。

20

【0040】

「ポリペプチド」の語は、2個またはそれ以上のサブユニットのアミノ酸、アミノ酸類似体、またはペプチドミメティクスの化合物を含む。サブユニットは、ペプチド結合により結合され得る。別の具体例では、サブユニットは、他の結合、例えばエステル、エーテルなどにより結合され得る。本明細書で使用している「アミノ酸」の語は、天然および/または非天然または合成アミノ酸、例えばグリシンおよびDまたはL光学異性体の両方、およびアミノ酸類似体およびペプチドミメティクスを包含する。3個またはそれ以上のアミノ酸のペプチドを一般にオリゴペプチドと称す。3個またはそれ以上のアミノ酸より大きいペプチド鎖をポリペプチドまたはタンパク質と称す。

30

【0041】

「ハイブリダイゼーション」の語は、1個またはそれ以上のポリヌクレオチドが反応することにより、ヌクレオチド残基の塩基間における水素結合を介して安定化される複合体を形成する反応を含む。水素結合は、ワトソン-クリック塩基対合、フーグスティーン結合、または他の配列特異的な形で起こり得る。複合体は、二重らせん構造を形成する2本鎖、多重鎖複合体を形成する3本またはそれより多い鎖、単自己ハイブリダイゼーション鎖、またはこれらの組み合わせを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、例えばPCR反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的開裂などの広範な過程における一段階を構成し得る。

40

【0042】

ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」条件下で実施され得る。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーは、任意の2個の核酸分子が互いに

50

ハイブリダイゼーションする際の難度を含む。ストリンジェント条件下において、互いに少なくとも60%、65%、70%、75%同一である核酸分子どうしは互いにハイブリダイゼーションするが、同一性パーセントが低い分子の場合ハイブリダイゼーションは起こり得ない。高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定な例は、約45で6倍塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)でのハイブリダイゼーション、次いで、50、好ましくは55、さらに好ましくは60、さらに好ましくは65での0.2倍SSC、0.1%SDS中での1回またはそれ以上の洗浄である。

【0043】

ハイブリダイゼーションが2本の1本鎖ポリヌクレオチド間において逆平行立体配置で起こる場合、この反応は「アニーリング」と呼ばれ、それらのポリヌクレオチドは「相補的」として記される。ハイブリダイゼーションが第一ポリヌクレオチドの鎖の一方と第二ポリヌクレオチドの鎖の一方の間で起こり得る場合、2本鎖ポリヌクレオチドは、もう一つのポリヌクレオチドと「相補的」または「相同的」であり得る。「相補性」または「相同性」（一ポリヌクレオチドがもう一つのポリヌクレオチドと相補的である度合）は、一般的に認められている塩基対合規則にしたがって、互いに水素結合すると予測される向かい合わせの鎖における塩基の比率に関して定量可能である。

10

【0044】

本明細書で使用している「マーカー」および「バイオマーカー」の語は、互換的に使用され、臓器拒絶反応に関する危険性が無い対象における量または活性に対し、臓器拒絶反応に関する危険性がある対象において、存在するかまたは統計的モデル（例、PLSDAおよびOPLS）を用いて測定された量または活性がモジュレーション（すなわち、増強または低減化）されているポリヌクレオチドまたはポリペプチド分子を含む。バイオマーカーの量または活性における相対変化は、拒絶反応の発生または発生の危険性と相関関係をなす。

20

【0045】

本明細書で使用している「マーカーのパネル」の語は、統計モデル（例、PLSDAおよびOPLS）を用いて測定された一群のバイオマーカーを含み、その各構成員の量または活性は臓器拒絶反応の発生または発生の危険性と相関関係を示す。ある例では、バイオマーカーのパネルは、臓器拒絶反応についての危険性がある対象において量または活性が増強されているバイオマーカーのみを含み得る。他の例では、バイオマーカーのパネルは、臓器拒絶反応についての危険性がある対象において量または活性が低減化されているバイオマーカーのみを含み得る。

30

【0046】

抜粋した語に関する略語を下記表1に要約する。

表1：略語：

【表 1】

略語	用語
AEBP/ACLP	脂肪細胞エンハンサー結合タンパク質/大動脈カルボキシラーゼ様タンパク質
Amn	Amnionless (アムニオンレス)
BMD	バイオマーカー発現
CAN	慢性同種移植腎症
CP	セルロプラスミン, フェロキシダーゼ
CSF2RB	コロニー刺激因子 2 受容体, ベータ
CV	分散係数
Dlg3, Ne-dlg	神経内分泌 discs large
Fzd-9	Frizzled 9
GLUT4/SLC2A1 2	溶質運搬体ファミリー 2 (促通グルコース輸送体), 構成員12
Hes-1	Hairy and enhancer of split 1
HGF	肝細胞増殖因子 (ヘパポイエチン A; 分散因子)
IGFBP4	インスリン様増殖因子結合タンパク質4
Lcn	ルミカン
NFAT	活性化T細胞の核因子
OPLS	部分最小二乗法による潜在的構造の正射影
PLS	部分最小二乗法による潜在的構造の射影
PLS-DA	部分最小二乗法-判別分析による潜在的構造の射影
pM5/NOMO	Nodalモジュレーター 2
Ski-1/SnoN	Ski-様 (snoN)
THRA	甲状腺ホルモン受容体アルファ

10

20

【発明の効果】

30

【0047】

慢性拒絶の予測バイオマーカー

本発明は、一つには、CANでは選択された遺伝子がモジュレーションされており、これらの遺伝子は明白なCAN発症前の予測マーカーとして使用され得るという発見に基づくものである。増大している多量のヒト遺伝子配列情報と組合わせた高度並列自動化DNAハイブリダイゼーション技術の進歩により、何千もの遺伝子に関する発現レベルを同時に解析することが可能となった(例、Schena et al., 1995, Science 270: 467-470; Lockhart et al., 1996, Nature Biotechnology 14: 1675-1680; Blanchard et al., 1996, Nature Biotechnology 14: 1649; Ashby et al., 1996年10月29日付米国特許第5569588号; Perou et al., 2000, Nature 406: 747-752参照)。遺伝子ごとの定量的RT-PCRなどの方法は、非常に正確ではあるが比較的労働集約的である。定量PCRを用いて何千もの遺伝子の発現を解析することは可能であるが、それに要する労力と費用は莫大である。それに代わる大規模解析の一例では、mRNAの集団全体をcDNAに変換し、概して10~10000またはそれ以上の遺伝子を表すプローブを規則正しく配列させたアレイとハイブリダイゼーションさせ得る。これらのプローブの各々とハイブリダイゼーションするcDNAの相対量が、対応する遺伝子の発現レベルの尺度である。次いで、データを統計分析することにより、遺伝子発現の情報のパターンを明らかにさせ得る。事実、腎臓同種移植拒絶の早期診断および新たな予後バイオマーカーは、免疫抑制を最小限にし、個人化するのに重要である。組織病理学的鑑別診断に加えて、遺伝子発現プロファイリングは、「分子

40

50

シグネチャー」の特定により疾病分類を著しく改善させる。

【0048】

これまで幾つかの試験法を効果的にトランスクリプトームアプローチに適用することにより、様々な種類の腎臓移植を区別してきた。しかしながら、マイクロアレイプラットフォームおよび様々なデータ分析法は不均質であるため、CANの確固たるシグネチャーの同定は困難になっている。

【0049】

この問題に取り組むため、比較多変量データ分析(例、PLSDA; OPLS; OSC)を、腎臓移植後少なくとも1年間は移植片機能が安定している患者および早期時点(06週目および12週目)の生検材料ではなく24週目生検材料で慢性同種移植腎症(CAN; 段階I)と診断された患者からの連続腎臓プロトコル生検材料の遺伝子発現プロフィールについて実施した。実施例1に示した通り、これらの試験は、CANの兆しを予測する分子シグネチャーを同定するものである。分子シグネチャーは、様々な時点でのアルゴリズムおよびアルゴリズムにより同定された遺伝子の組み合わせを含む。すなわち、本発明は、拒絶反応中、特に初期CAN中にモジュレーション(すなわち、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーション)されている遺伝子の同定に関するものである。1つまたはそれ以上のバイオマーカー遺伝子(複数も可)の発現とCANの間に非常に統計的に有意な相関関係が見出されることにより、移植拒絶(例、CAN)に関する「分子シグネチャー」が提供される。これらのバイオマーカー遺伝子およびそれらの発現産物は、拒絶反応が起こっていると思われる臓器を同定するのに有用であるため、それらは移植拒絶の危険がある患者の管理、予後および処置で使用され得る。

10

20

【0050】

CANの臨床的特徴

慢性移植片機能不全は、移植後何カ月から何年間かけて徐々に移植片機能の悪化を示す固体臓器移植片における現象であり、結局は移植片生着不全に至り、特有の組織学的特徴を伴うものである。臨床的には、腎臓移植片における慢性同種移植腎症(すなわち、CAN)は、それ自体、通常タンパク尿および動脈高血圧と共に、糸球体濾過量の緩慢な漸進的下降として症状を表わす。

【0051】

全ての実質同種移植片におけるCANの基本的な組織病理学的特徴は、線維増殖性動脈内膜炎である。血管病変が動脈の全長をつぎはぎパターンで冒していく。同心円状に筋内膜が増殖することにより、線維性肥厚化および小動脈における内膜の特有な「玉ねぎの皮」様病変が生じる。他の所見には、内皮腫脹、泡沫細胞蓄積、内弾性板の破壊、ヒアリン症および内側肥厚化、および内皮下層Tリンパ球およびマクロファージの存在がある(Hruban RH et al., Am J Pathol 137(4): 871-82(1990))。さらに、永続性限局性脈管周囲炎症も見られることが多い。

30

【0052】

血管の変化に加えて、CANに冒されている腎臓は、線維症、尿細管萎縮および糸球体症(glomerulopathy)も示す。慢性移植糸球体症-毛細管壁の折れ重なりおよび糸球体間質増加は、CANに冒された腎臓の非常に特異的な特徴として認められている(Sorez K, Clin Transplant; 8(3 Pt 2): 345-50(1994))。特異性の劣る病変は、糸球体虚血性虚脱、尿細管萎縮、および間隙性線維症である。さらに、尿細管周囲の毛細管基部分裂および層状化は、晩期の移植片機能衰退に随伴している(Monga M et al., Ultrastruct Pathol. 14(3): 201-9(1990))。腎臓同種移植片におけるCANの組織学的診断に関する基準は、腎臓同種移植病理学に関するBanff97スキーム(Racusen LC et al., Kidney Int. 55(2): 713-23(1999))で国際的に標準化されている(Kouwenhoven et al., Transpl Int. 2000; 13(6): 385-401(2000))から採用)。表2は、慢性/硬化性同種移植腎症(CAN)に関するBanff 97基準を要約している(Racusen LC et al., Kidney Int. 55(2): 713-23(1999))。

40

50

【表 2】

段階	組織病理学的所見
I - 軽度	慢性拒絶を示唆する特異的な変化を伴わない場合(a)または伴う場合(b)の軽度の間隙性線維症および尿細管萎縮
II - 中等度	中等度の間隙性線維症および尿細管萎縮(a)または(b)
III - 重度	重度の間隙性線維症および尿細管萎縮および尿細管喪失 (a) または(b)

【0053】

Banff 97についての「適切な」標本は、10またはそれ以上の糸球体(glomeruli)および少なくとも2つの動脈を伴う生検材料として定義される。CANのプロセスを理解するために2つの作業仮説が提起されている(Kouwenhoven et al., Transpl Int. 2000; 13(6): 385-401, 2000)。第一の、そして恐らくは最も重要な一群の危険因子は、「アロ抗原依存的」、免疫学的または拒絶関連因子の名称のもとで一まとめにされている。これらのうち、急性拒絶エピソードの後発的発現および数の増加、レシピエント年齢の若さ、男性対女性の性別ミスマッチ、自己免疫肝炎または胆道疾患の一次診断、基準免疫抑制および非白色人種のレシピエントは全て、慢性拒絶発症の危険増加と関連している。さらに具体的には、(a)組織適合性：長期移植片生存は、ドナーとレシピエント間における組織適合性の相性度と強い相関関係を示すと思われる；(b)急性拒絶：急性拒絶エピソードの発現、頻度および重症度は、CANの独立危険因子である。急性拒絶はCAN発生について最も一貫して認められている危険因子である；(c)シクロスポリンの低すぎる維持用量またはコンプライアンスの悪さに起因する最適状態には及ばない免疫抑制；および(d)抗ドナー特異的抗体：多くの試験は、移植後、患者の大多数が抗体を産生することを示している。第二群の危険因子は、慢性拒絶反応発症の一因でもある「非アロ抗原依存的」または「非免疫学的」危険因子と称され、ドナーの高齢化、ドナー臓器における既存のアテローム性動脈硬化、および長い冷阻血時間を含む。病気および損傷、例えば虚血に対する非アロ免疫応答は、CANを誘発またはさらに悪化させ得る。さらに具体的には、(a)もとの疾患、例えば糸球体腎炎の再発；(b)移植手術創傷の結果；(c)阻血の持続時間：内膜過形成は阻血持続時間と相関関係を示す；(d)死体からの腎臓移植片対生きていた関連および非関連ドナーからの同移植片；(e)ウイルス感染：CMV感染は細胞間接着分子、例えばICAM-1に直接影響を及ぼす；(f)高脂血症；(g)高血圧；(h)年齢；(i)性差：移植動脈硬化の兆候は女性より男性の方が早く現れた；(j)人種；および(k)機能組織の量 - ネフロンの数の減少および過剰濾過。

【0054】

CANは、移植臓器の破壊の形態学的形跡を特徴とする。全実質臓器の共通特性は、内膜過形成の発生である。T細胞およびマクロファージは、優勢な侵入性移植片細胞型であり、CD8⁺TよりCD4⁺T細胞が多い。接着分子(ICAM-1、VCAM-1)およびMHC抗原の発現増加は、CANに冒された同種移植片で見られ、多くの場合高いTGF- β が見出される。移植片がCANを発症し得る経路の簡単な説明は以下の通りである：

【0055】

虚血、外科的手技および再灌流創傷による内皮細胞活性化。結果的に、内皮細胞は酸素不含有基を産生し、それらは増量のサイトカインIL-1、IL-6、IFN- γ 、TNF- α およびケモカインIL-8、マクロファージ化学誘引性タンパク質1(MCP-1)、マクロファージ炎症性タンパク質1および1(MIP-1、MIP-1)、コロニー刺激因子、および多様な成長因子、例えば血小板由来増殖因子(PDGF)、インスリン様増殖因子1(IGF-1)、トランスホーミング成長因子(TGF- β)および前血栓分子、例えば組織因子およびプラスミノゲン活性

10

20

30

40

50

化因子阻害剤（P A I）を放出する。これらのサイトカイン類が、損傷部位への好中球、単球 / マクロファージおよびTリンパ球の移動を活性化することにより、それらはI C A M - 1、V C A M - 1、P - およびE - セレクチンを含む接着分子を介して内皮細胞と相互作用する。これらの接着分子の発現増加は、サイトカインI L - 1、I F N - およびT N F - により誘導される。白血球の管外遊出は、活性化補体および内皮細胞間の透過性を高める酸素不含有基により促進される。

【0056】

C A N 診断に関する現行の臨床アプローチに対する限界

拒絶、例えばC A Nと移植片機能不全に関する他の病因の診断の区別および有効な治療法の設定は、(a) 拒絶の診断に利用可能な最善の現行手段である、移植片の経皮的コア針生検は、通常、移植片機能不全および移植片障害（場合によっては不可逆的）が既に存在するという「事実」があつて初めて実施される、(b) 移植片の形態学的分析からは、所与の拒絶エピソードを後退させる可能性に関する限られた手掛かり、および再発（「リバウンド」）の尤度に関する僅かな手掛かりが得られるに過ぎない、および(c) 治療戦略の設計のための前提条件である、拒絶現象の機械論的根拠は、拒絶の形態学的特徴を含む現行の診断指数により十分に定義されているわけではないため、複雑なプロセスとなっている。

10

【0057】

例えば、腎臓同種移植拒絶の診断は、通常移植片機能不全の発現（例、血清クレアチニン濃度の増加）および単核細胞浸潤も示している移植片領域における移植片損傷の形態学的証拠により下される。しかしながら、拒絶経過の指標として腎機能の異常を用いることについては、2つ警告すべき点がある：第1に、死体の腎臓移植片の多くは、摘出および生体外保存処置により被った損傷故に移植直後の期間は急性（可逆性）腎不全に陥っていることから、腎機能の衰退が拒絶を診断するための臨床的手掛かりとして必ずしも利用可能とはいえない。第2に、腎臓機能が直接的に損なわれていない場合でさえ、非免疫学的原因、例えば免疫抑制療法そのものにより、移植片機能不全が発生することもあり得る。

20

【0058】

例えば、シクロスポリン（C s A）の血漿 / 血液濃度に基づくだけでは容易に識別されない合併症であるC s A腎毒性は、よく見られる合併症である。拒絶反応に対しては免疫抑制剤用量の段階的上昇、そして腎毒性に対してはC s A用量の低減化というように治療戦略が全く反対であるため、C s A腎毒性から拒絶を区別する臨床的重要性をあまり強調することはできない。

30

【0059】

本発明は、一つには、1つまたはそれ以上の遺伝子および / またはコード化されたタンパク質の発現の増加または減少が、ある種の移植片拒絶状態と関連しているという観察に基づいている。本明細書記載のデータの結果として、本方法は、同種移植生検材料が緩やかな細胞浸潤しか示していない場合でさえ、急性および慢性拒絶の迅速で信頼できる診断を下すのに現時点でも利用可能である。本明細書では、同時にモジュレーション（例、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーション）され、分子シグネチャーを提供することにより移植拒絶を正確に検出させ得る複数遺伝子の分析について記載している。

40

【0060】

さらに本発明は、適切なバイオマーカー遺伝子の発現を測定する古典的分子方法および大規模方法を提供する。本明細書記載の方法は、慢性移植拒絶、好ましくは早期慢性移植拒絶を検出するのに特に有用である。一具体例では、慢性移植拒絶はC A Nの結果である。最も典型的には、対象（すなわち、移植体のレシピエント）は哺乳類、例えばヒトである。移植臓器は、移植可能な臓器または組織であればよく、例えば腎臓、心臓、肺、肝臓、膵臓、骨、骨髄、腸、神経、幹細胞（または幹細胞由来細胞）、組織成分および組織複合物が含まれ得る。好ましい例では、移植体は腎臓移植体である。

【0061】

本明細書記載の方法は、抗拒絶療法の効力を評価するのに有用である。上記方法では、

50

バイオマーカー遺伝子の転写物の投与前規模と、同遺伝子の転写物の投与後規模を比較し、遺伝子転写物の投与後規模が同遺伝子転写物の投与前規模より小さい場合、抗拒絶療法が有効であることを示すものとする。移植拒絶の予防および/または処置についての候補（例えば、薬剤、抗体、または拒絶または予防の他の形態）は、候補への暴露の前と後におけるバイオマーカー発現の規模を比較することによりスクリーニングにかけられ得る。さらに、この方法で集められた貴重な情報は、生物学的材料の評価を実施している対象について将来的な臨床管理体制を決定する際の助けとなり得る。評価は、対象からの試料を用いて、バイオマーカー遺伝子の遺伝子発現の規模を測定する本明細書記載の方法を用いることにより実施され得る。分析は、さらに感染源の検出も含み得る。

【0062】

本発明バイオマーカーと関連した生物学的経路

本発明のバイオマーカーにより、CANによる影響を受ける選択された生物学的経路が同定され、これらの生物学的経路は、それ自体固体臓器同種移植腎症と直接的に関連している。事実、このメタアナリシスは、遺伝子クラスターを表し得る選択された生物学的経路についての堅固なバイオマーカーシグネチャーを明らかにした。上記生物学的経路には、例えばwnt経路（すなわち、NFAT (Murphy et al., J Immunol. 69 (7) : 3717 - 25 (2002)) ; NE-dlg (Hanada et al., Int.J.Cancer 86 (4) : 480 - 8 (2000)) ; frizzled-9 (Karasawa et al., J.Biol.Chem. 277 (40) : 37479 - 86 (2002)) ; Hes-1 (Deregowski et al., J Biol Chem. 281 (10) : 6203 - 10 (2006)) ; Piscione et al., Gene Expr.Patterns 4 (6) : 707 - 11 (2004))、TGFベータ/Smadシグナリング経路（すなわち、Smad3 (Saika et al., Am.J.Pathol. 164 (2) : 651 - 63 (2004)) ; Smad2 (Ju et al., Mol.Cell Biol. 26 (2) : 654 - 67 (2006)) ; pM5/NOMO (Hafner et al., EMBO J. 2004年8月4日 ; 23 (15) : 3041 - 50 ; SnoN (Zhu et al., Mol.Cell Biol. 25 (24) : 10731 - 44 (2005)) ; Wilkinson et al., Mol.Cell Biol. 25 (3) : 1200 - 12 (2005))、グルコースおよび脂肪酸輸送および代謝（すなわち、GLUT4 (Linden et al., Am J Physiol Renal Physiol. 290 (1) : F205 - 13 (2006))、血管平滑筋分化（すなわち、ルミカン (Onda et al., 72 (2) : 142 - 9 (2002)) ; セルロプラスミン (Chen et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. 281 (2) : 475 - 82 (2001))、アムニオンレス (Moestrup SK, Curr Opin Lipidol. 16 (3) : 301 - 6 (2005)) ; 大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質 (ACLP))、血管硬化 (THRA (Sato et al., Circ.Res. 97 (6) : 550 - 7 (2005)) ; IGFBP4 ; AE結合タンパク質 - 1 (Layne et al., J.Biol.Chem. 273 (25) : 15654 - 60 (1998)) ; Abderrahim et al., Exp.Cell Res. 293 (2) : 219 - 28 (2004)) ; ECM (コラーゲン)、および免疫応答 (NFAT (Murphy et al., J Immunol. 69 (7) : 3717 - 25 (2002)) ; TNF、GM-CSF (Steinman R.M., Annu Rev.Immunol 9 : 271 - 96 (1991)) ; Xu et al., Trends Pharmacol.Sci. 25 (5) : 254 - 8 (2004))があるが、これらに限定されるわけではない。Jehle および共同研究者らは、血清中におけるインスリン様増殖因子結合タンパク質4が慢性腎不全に特有なものであることを立証した。Jehle et al., Kidney Int. 57 (3) : 1209 - 10 (2000)。Azuma および共同研究者らは、肝細胞増殖因子 (HGF) が、急性虚血損傷からの腎臓再生および保護において向腎的役割を演じること、およびHGF処置が、ラットモデルでのCANの後続的発症に対する感受性の低下に大きく貢献することを示した。Azuma et al., J.Am.Soc.Nephrol. 12 (6) : 1280 - 92 (2001)。

【0063】

大規模遺伝子発現解析の出現により、遺伝子群は多くの場合まとめて共役発現されることが明らかにされた。例えば、酵母サッカロマイシス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) における全ゲノム発現解析は、ジオーキシーシフトとして知られる成長条件の変

10

20

30

40

50

化中における代謝遺伝子の同調的調節を示した (DiRisi et al., 1997, Science 278: 680 - 686; Eisen et al., 1998, PNAS 95: 14863 - 14868)。ジオキシシフトは、グルコースをエタノールに発酵させる酵母細胞が培地中のグルコースを使い果たし、エタノールを代謝し始めたときに起こる。グルコースの存在下では、解糖経路の遺伝子が発現され、グルコースからエタノールへの発酵を実施する。グルコースを使い果たされたとき、酵母細胞は、クレブス回路および呼吸に大きく依存する過程である、エタノールの代謝を行わなければならない。

【0064】

したがって、解糖遺伝子の発現が減少し、クレブス回路および呼吸遺伝子の発現が同調的に増加する。同様の同調遺伝子調節は、様々な癌細胞からも見出される。細胞周期の進行およびDNA合成に關与するタンパク質をコード化する遺伝子は、癌細胞で同調的に過剰発現されることが多い (Ross et al., 2000, Nature Genet. 24: 227 - 235; Perou et al., 1999, PNAS 96: 9212 - 9217; Perou et al., 2000, Nature 406: 747 - 752)。

10

【0065】

遺伝子の同調調節は、機能的観点から見て論理的である。ほとんどの細胞プロセスは、多様な遺伝子を必要とし、例えば、解糖、クレブス回路、および細胞周期の進行は全て多遺伝子プロセスである。したがって、機能的に関連した遺伝子の共役発現は、細胞に様々な細胞活動を遂行させるのに不可欠である。上記の遺伝子群は、「遺伝子クラスター」と称され得る (Eisen et al., 1998, PNAS 95: 14863 - 68)。

20

【0066】

遺伝子発現のクラスタリングは、機能的必要性だけでなく、転写制御機構による当然の成り行きでもある。遺伝子発現は、主として調節エレメントとも呼ばれるシス作用DNA配列に結合する転写調節因子により調節される。特定遺伝子に関する発現パターンは、その遺伝子に作用する様々な転写調節因子の活性を合わせた結果である。したがって、類似した一連の調節エレメントを有する遺伝子はまた、類似した発現パターンを有し、群がる傾向を有する。勿論、異なる調節エレメントを有する遺伝子がある種の環境下で共役発現されることも可能であり、全く一般的なことである。

【0067】

複数の遺伝子クラスターの分析は、移植拒絶の診断のみならず、適切な医学的介入の決定にも有用であることが予測される。例えば、慢性同種移植腎症は、多くの変異型および多種多様な最適な治療戦略を有する疾患についての一般的表現である。一実施態様において、本発明は、同時に移植拒絶を識別し、適切な処置を決定する方法を提供する。概して、本発明は、適切な治療プロトコルを指示する、遺伝子クラスターを表し得る種々の情報的バイオマーカー遺伝子の典型を測定することを含む方法を提供する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0068】

遺伝子発現の検出

本発明のある実施態様では、発現規模を、対象から得た試料における1つまたはそれ以上のバイオマーカー遺伝子について測定する。試料は、対象から、例えば移植片生検材料から得た細胞を含み得る。他の試料には、流体試料、例えば血液、血漿、血清、リンパ液、CSF、囊胞液、腹水、尿、糞尿および胆汁があるが、これらに限定されるわけではない。また、試料は、気管支肺胞洗浄液、胸膜液または腹膜液、または正常または異常に機能している同種移植片により分泌または排泄される他の流体、または同種移植片を通して、または同種移植片の解剖学的近位での滲出または濾出から生じる他の流体、または同種移植片との液体連通における流体から得られる。

40

【0069】

遺伝子発現の測定については多くの異なる方法が当業界では知られている。古典的方法には、定量的PT-PCR、ノーザンブロットおよびリボヌクレアーゼ保護検定法がある。本明細書記載のある例では、競合的逆転写(RT)-PCRを用いることにより、バイ

50

オマーカー遺伝子の発現の規模を測定する。上記方法を用いることにより、対象遺伝子および遺伝子クラスター全体の発現を調べることが可能である。しかしながら、調べるべき遺伝子の数が増えると、時間と費用も手に負えないものとなり得る。

【0070】

大規模検出方法により、多くの遺伝子の発現レベルの迅速で安価な同時分析が可能となった。上記方法は、典型的には固体基材に固定化したプローブの規則正しいアレイを必要とする。各プローブは、異なるセットの核酸とハイブリダイゼーションし得る。一方法では、興味の対象である様々な遺伝子のコーディング領域の実質的部分を増幅または合成することにより、プローブを作製する。次いで、これらの遺伝子を固体支持体にスポットする。次いでmRNA試料を得、cDNAに変換し、増幅および（通常蛍光性標識により）標識する。次いで、標識cDNAをアレイに適用し、cDNAを、それらの濃度と線形関係を示す形でそれぞれのプローブとハイブリダイゼーションさせる。標識の検出により、アレイに付着した各cDNAの量が測定され得る。上記DNAアレイ実験の多くの実施方法が当業界では公知である。典型的な方法を以下に記載しているが、限定を意図したものではない。

10

【0071】

マイクロアレイは当業界では公知であり、遺伝子産物（例、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド）に順序どおりに対応しているプローブが既知の位置で結合される表面により構成される。一実施態様において、マイクロアレイは、各位置が遺伝子によりコード化される産物（例、タンパク質またはRNA）について別々の結合部位を表し、結合部位が生物体ゲノムにおける遺伝子の大部分またはほとんど全部の産物について存在するアレイ（すなわち、マトリックス）である。好ましい実施態様では、「結合部位」（以後、「部位」）は、特定同族cDNAが特異的にハイブリダイゼーションし得る核酸または核酸誘導体である。結合部位の核酸または誘導体は、例えば合成オリゴマー、完全長cDNA、完全長未満のcDNAまたは遺伝子フラグメントであり得る。

20

【0072】

通常、マイクロアレイは、少なくとも100、さらに好ましくは500、1000、4000またはそれ以上の遺伝子に対応する結合部位を有する。ある実施態様において、最も好ましいアレイは、示された特定生物体の遺伝子の約98~100%を有する。他の実施態様では、少数の特に選択された遺伝子に対応する結合部位を有するカスタマイズされたマイクロアレイが使用され得る。ある実施態様において、カスタマイズされたマイクロアレイは、4000未満、1000未満、200未満または50未満の遺伝子についての結合部位を含み、表4、表5、表6、表7および表8のバイオマーカーのいずれかのうち少なくとも2個、好ましくは少なくとも3、4、5個またはそれ以上の遺伝子についての結合部位を含む。好ましくは、マイクロアレイは、興味の対象である生物学的ネットワークモデルの試験および確認に適切な遺伝子に関する結合部位を有する。

30

【0073】

マイクロアレイと接触させる核酸は、様々な方法で製造され得る。全体およびポリ(A)+RNAの製造方法は、公知であり、Sambrook et al.、前出で総括的に記載されている。標識cDNAは、オリゴdT-プライマーまたはランダム-プライマー逆転写によりmRNAから製造され、両方とも当業界では公知である（例、Klug および Berger、1987、Methods Enzymol. 152: 316-325参照）。逆転写は、検出可能な標識に結合させたdNTP、最も好ましくは蛍光標識dNTPの存在下で実施され得る。別法として、単離mRNAは、標識dNTPの存在下における2本鎖cDNAのインビトロ転写により合成される標識アンチセンスRNAに変換され得る（Lockhart et al.、1996、Nature Biotech.、14: 1675）。cDNAまたはRNAは、検出可能な標識の非存在下で合成され得、それに続いて例えばピオチニル化dNTPまたはrNTPを組み込むかまたは類似手段（例、ピオチンのプロラレン誘導体をRNAに光架橋する）によりそれらを標識し、次いで標識ストレプトアビジン（例、フィコエリトリン標識ストレプトアビジン）または均等内容物質を付加し得る。

40

50

【0074】

蛍光標識を使用するとき、多くの適切な発蛍光団が知られており、フルオレセイン、リサミン、フィコエリトリン、ローダミン (Perkin Elmer Cetus)、Cy 2、Cy 3、Cy 3.5、Cy 5、Cy 5.5、Cy 7、蛍光体 X (Amersham) などが挙げられる (例えば、Kricka、1992、Academic Press、サンディエゴ、カリフォルニア、参照)。

【0075】

別の実施態様では、蛍光標識以外の標識を使用する。例えば、一放射性標識、または異なる放射スペクトルをもつ一対の放射性標識が使用され得る (Zhao et al.、1995、Gene 156 : 207 ; Pietu et al.、1996、Genome Res. 6 : 492 参照)。しかしながら、放射性同位元素の使用はそれほど好ましくない例である。

10

【0076】

核酸ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件については、標識核酸の集団が、マトリックスに固定化された適切な相補的核酸と特異的にハイブリダイゼーションするように選択する。本願で使用しているところでは、ポリヌクレオチドの短い方が25塩基またはそれ未満である場合に標準塩基対合規則によると誤対合が無く、またはポリヌクレオチドの短い方が25塩基より長い場合に誤対合が5%以下であるとき、一方のポリヌクレオチド配列は、他方と相補的であると考えられる。

【0077】

最適ハイブリダイゼーション条件は、標識核酸および固定化ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの長さ (例、オリゴマー対200塩基より大きいポリヌクレオチド) およびタイプ (例、RNA、DNA、PNA) により異なる。核酸についての特異的 (すなわち、ストリンジェントな) ハイブリダイゼーション条件に関する一般的パラメーターは、Sambrook et al.、前出、および Ausubel et al.、1987、Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing および Wiley-Interscience、ニューヨーク) に記載されており、これらを目的に応じて出典明示により援用する。アレイへの標識核酸の非特異的結合は、アレイを大量の非特異的DNAで処理すること、いわゆる「ブロッキング」段階により低減化され得る。

20

【0078】

蛍光標識プローブを使用するとき、転写物アレイの各部位での蛍光放射は、好ましくは走査型共焦レーザー顕微鏡により検出され得る。2種の発蛍光団を使用するとき、使用する2種の発蛍光団のそれぞれについて、適切な励起線を用いて別々の走査を実施する。別法として、2種の発蛍光団に対し特異的な波長での同時試料照明を可能にするレーザーが使用され得、2種の発蛍光団からの放射は同時に分析され得る (Shalon et al.、1996、Genome Research 6 : 639 - 645 参照)。好ましい実施態様では、コンピューター制御 X-Y ステージおよび顕微鏡対物レンズを備えたレーザー蛍光スキャナーでアレイを走査する。2発蛍光団の連続励起を多波長型混合ガスレーザーで達成し、放射光線を波長により分解し、2つの光電子倍增管で検出する。蛍光レーザー走査装置は、Schena et al.、1996、Genome Res. 6 : 639 - 645 および本明細書で挙げた他の参考文献に記載されている。別法として、Ferguson et al.、1996、Nature Biotech. 14 : 1681 - 1684 に報告された光ファイバー束を用いることにより、多数の部位で同時に mRNA 存在量レベルをモニターすることが可能である。蛍光マイクロアレイスキャナーは、Affymetrix、Packard BioChip Technologies、BioRobotics および多くの他の供給会社により市販されている。

30

40

【0079】

様々なコンピューターソフトウェアを用いて、シグナルを記録し、定量化し、分析する。一実施態様では、走査画像を、グラフィクスプログラム (例、Hijaak Graphics Suite) を用いてスペックル除去し、次いで各部位における各波長での平均ハイブリダイゼーションのスプレッドシートを作成する画像グリッドプログラムを用いて解析する。必要ならば、2つの蛍光体に関するチャンネル間の「クロストーク」 (またはオーバーラップ) について実験的に決定した補正を行い得る。転写物アレイ上の特定ハイブリダイゼーション

50

部位について、好ましくは2種の発蛍光団の放射の比を計算する。この比は、同族遺伝子の絶対発現レベルとは無関係であるが、発現が薬剤投与、遺伝子欠失または他の試験事象により著しくモジュレーションされる遺伝子には有用である。

【0080】

一実施態様において、2種の標識が異なるcDNAセットの混合物をマイクロアレイとハイブリダイゼーションさせることにより、興味の対象である細胞の転写状態を反映する転写物アレイを作製する。一方の細胞は興味の対象である細胞であり、他方は標準化対照として使用される。したがって、マイクロアレイとの各細胞のcDNAの相関的ハイブリダイゼーションは、2細胞における各遺伝子の相対的発現を反映する。

【0081】

好ましい実施態様では、様々な統計的方法を用いることにより、異なる試料および条件におけるバイオマーカーモデルの遺伝子の発現レベルが比較され得る。様々な統計的方法が、異なる遺伝子の発現パターンにおける関連性の度合いを評価するのに利用可能である。統計的方法は、2つの関連部分に分けられる：1個またはそれ以上の遺伝子の発現パターンの関連性を決定する測定基準法、および適切な測定基準法に基づいた発現データを組織化および分類する、クラスタリング方法 (Sherlock、2000、Curr.Opin.Immunol. 12:201-205; Butte et al.、2000、Pacific Symposium on Biocomputing、ハワイ、World Scientific、p 418-29)。

【0082】

一実施態様では、ピアソンの相関関係が測定基準法として使用され得る。簡単に述べると、所与の遺伝子について、遺伝子発現レベルの各データポイントにより、全条件に及ぶその遺伝子に関する遺伝子発現レベルの全体平均からの遺伝子発現の偏差を表すベクトルが定められる。次いで、各遺伝子の発現パターンは、一連のプラスおよびマイナスのベクトルとして考察され得る。次いで、各遺伝子のベクトルを互いに比較することにより、ピアソン相関係数が計算され得る。かかる方法の一例は、Eisen et al. (1998、前出) に記載されている。ピアソン相関係数は、ベクトルの向きの説明となるが、規模について説明するものではない。

【0083】

別の実施態様では、ユークリッド距離測定法が測定基準法として使用され得る。これらの方法では、ベクトルを各条件での各遺伝子について計算し、遺伝子に関するベクトルが描く点の間の多次元空間における絶対距離に基づいて比較する。別の実施態様では、ユークリッド距離測定および相関係数の両方をクラスタリングで使用した。

【0084】

さらなる実施態様では、遺伝子発現パターンの関連性がエントロピー計算により決定され得る (Butte et al. 2000、前出)。各遺伝子の発現パターンについてエントロピーを計算する。次いで、2遺伝子について計算したエントロピーを比較することにより、相互情報量を測定する。個々に各遺伝子について計算したエントロピーから結合遺伝子発現パターンエントロピーを減じることにより、相互情報量を計算する。2遺伝子の発現パターンが異なるほど、結合エントロピーも高くなり、計算される相互情報量は低くなる。したがって、高い相互情報量は、2つの発現パターン間における非ランダムな関連性を示す。

【0085】

別の実施態様では、凝集型クラスタリング方法を用いることにより、遺伝子クラスターを同定し得る。一実施態様では、ピアソン相関係数またはユークリッド測定基準を各遺伝子について決定し、次いで樹形図を形成する基礎として使用する。一例では、極めて密接な相関係数をもつ遺伝子対について遺伝子を走査した。次いで、枝の奥行の間の距離を相関度と比例させて、これらの遺伝子を節点で連結した樹形図の2本の枝に配置する。段々に枝を木に付け加えながら、この処理を続行する。最終的に、短い枝で連結された遺伝子がクラスターを表し、長い枝で連結された遺伝子がクラスターを形成していない遺伝子を表す樹形図が形成される。ユークリッド測定基準法による多次元空間における点を用いて

10

20

30

40

50

も樹形図を作成することが可能である。

【0086】

さらに別の実施態様では、分枝型クラスタリング方法が使用され得る。例えば、各遺伝子の発現パターンにベクトルを割り当て、2つのランダムベクトルを作成する。次いで、各遺伝子を、一ベクトルと適合する可能性に基づいて2つのランダムベクトルのその一方に割り当てる。ランダムベクトルを繰り返し再計算することにより、遺伝子を2群に分割する2つの重心を作成する。この分割により樹形図の基部に主要な枝が形成される。次いで、各群をさらに同じ要領で分割し、最終的に完全に枝分かれした樹形図が得られる。

【0087】

さらなる実施態様では、自己組織化マップ(SOM)を用いてクラスターを形成させ得る。一般的には、例えば上記のユークリッド測定基準法などの測定基準法を用いることにより、遺伝子発現パターンをn次元空間でプロットする。次いで、重心の格子をn次元空間に配置し、重心を点のクラスターに向かって移動させることにより、遺伝子発現のクラスターが表わされる。最終的に、重心は、遺伝子クラスターの一種の平均的なものである遺伝子発現パターンを表す。ある実施態様では、SOMを用いて重心を作成し、各重心でクラスターを形成する遺伝子がさらに樹形図により表示され得る。典型的な方法は、Tama yo et al.、1999、PNAS 96:2907-12に記載されている。一旦重心が形成されると、前記方法の一つにより相関関係が評価され得る。

10

【0088】

別の実施態様では、PLSDA、OPLSおよびOSC多変量解析が分類手段として使用され得る。実施例1で詳述しているところによると、本発明のバイオマーカーモデル(例、PLSDA、OPLSおよびOSCモデルおよび上記モデルにより同定される遺伝子)は、潜在的CANおよび/または早期CANに冒された組織を分類するのに有用である。

20

【0089】

別の態様において、本発明はプローブセットを提供する。好ましいプローブセットは、1個またはそれ以上の遺伝子の発現を検出するように設計され、移植片の状態に関する情報を提供する。本発明の好ましいプローブセットは、表4、表5、表6、表7および表8のバイオマーカー遺伝子のいずれかに属する少なくとも2個の遺伝子の検出に有用なプローブを含む。本発明のプローブセットは、10000以下の遺伝子転写物の検出に有用なプローブを含み、好ましいプローブセットは、4000未満、1000未満、200未満、100未満、90未満、80未満、70未満、60未満、50未満、40未満、30未満、20未満、10未満の遺伝子転写物の検出に有用なプローブを含む。本発明のプローブセットは、移植体の状態に関する情報を与える遺伝子転写物の検出に標的を定めている。本発明のプローブセットはまた、移植体の状態に関する情報を与えるわけではない遺伝子転写物を検出する多数または少数のプローブを含み得る。好ましい実施態様では、本発明のプローブセットは、固体基材に固定されることによりプローブのアレイを形成する。プローブセットはまた、マルチプレックスPCRにも有用であり得ることが期待される。プローブセットのプローブは、核酸(例、DNA、RNA、DNAおよびRNAの化学的修飾形態)、またはPNA、または目的核酸配列と特異的に相互作用し得る他のポリマー化合物であり得る。

30

40

【0090】

本発明のバイオマーカー(複数も可)を含むコンピューターで読み取り可能な媒体も提供される。上記で使用している「コンピューターで読み取り可能な媒体」は、コンピューターで読み取り、直接アクセスできる媒体を包含する。上記媒体には、磁気記憶媒体、例えばフロッピーディスク、ハードディスク記憶媒体、および磁気テープ;光記憶媒体、例えばCD-ROM;電気記憶媒体、例えばRAMおよびROM;およびこれらの範疇のハイブリッド、例えば磁気/光記憶媒体があるが、これらに限定されるわけではない。現在知られているコンピューターで読み取り可能な媒体のいずれかを用いて、本発明のバイオマーカーをそこに記録させたコンピューターで読み取り可能な媒体を含む製品を作製する

50

方法については、当業者であれば容易に理解できるはずである。

【0091】

上記で使用している「記録させた」は、コンピューターで読み取り可能な媒体に情報を保存する処理を含む。当業者であれば、コンピューターで読み取り可能な媒体に情報を記録する現在公知の方法のいずれかを採用することにより、本発明のバイオマーカーを含む製品を容易に作製し得るはずである。

【0092】

様々なデータ処理装置のプログラムおよびフォーマットを用いることにより、コンピューターで読み取り可能な媒体に本発明のバイオマーカー情報を保存することが可能である。例えば、バイオマーカーに対応する核酸配列は、市販のソフトウェア、例えばWordPerfect および MicroSoft Wordでフォーマット化される、言語処理テキストファイルで表示されるか、またはデータベースアプリケーション、例えばDB2、Sybase、Oracleなどに保存される、ASCIIファイル形式で表示され得る。幾つかのデータ処理装置構造化フォーマット（例、テキストファイルまたはデータベース）を適合させることにより、本発明のバイオマーカーを記録させたコンピューターで読み取り可能な媒体が得られる。

10

【0093】

コンピューターで読み取り可能な形態で本発明のバイオマーカーを提供することにより、常用手順で様々な目的に関するバイオマーカー配列情報にアクセスすることが可能である。例えば、当業者であれば、コンピューターで読み取り可能な形態で本発明のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を用いることにより、標的配列または標的構造モチーフを、データ記憶装置内に保存された配列情報と比較することができるはずである。検索手段を用いることにより、特定標的配列または標的モチーフと適合する本発明配列のフラグメントまたは領域が同定される。

20

【0094】

本発明はまた、本発明バイオマーカー（複数も可）を含むアレイを包含する。アレイを用いることにより、アレイにおける1個またはそれ以上の遺伝子の発現が検定され得る。一実施態様では、アレイを用いて組織における遺伝子発現を検定することにより、アレイにおける遺伝子の組織特異性を確認することが可能である。この方法では、約4700までの遺伝子が発現について同時に検定され得る。これにより、1つまたはそれ以上の組織で特異的に発現される一群の遺伝子を示すプロフィールが明らかにされ得る。

30

【0095】

上記の定性的測定に加えて、本発明では遺伝子発現が定量化され得る。すなわち、組織特異性に加えて、組織における一群の遺伝子の発現レベルも確認され得る。したがって、遺伝子は、それらの組織発現性そのものおよびその組織での発現レベルに基づいて分類され得る。これは、例えば2つまたはそれ以上の組織の間における遺伝子発現の関係を確かめるのに有用である。すなわち、一組織を揺動させ、第2組織での遺伝子発現に対するその影響が測定され得る。この状況で、生物学的刺激因子に対する応答における一細胞型に対する別の細胞型の影響が測定され得る。かかる測定は、例えば遺伝子発現レベルでの細胞対細胞の相互作用の影響を知るのに有用である。ある細胞型を処置するために治療上作用物質を投与したところ、その作用物質が別の細胞型に対して望ましくない作用を有する場合、本発明は、望ましくない作用の分子的根拠を調べる検定法を提供することから、中和作用物質を併用投与するかまたは別の手段で望ましくない作用を処置する機会を提供するものである。同様に、単細胞型内でさえ、望ましくない生物学的作用が分子レベルで測定され得る。すなわち、標的以外の遺伝子の発現に対する作用物質の効果も確認および中和され得る。

40

【0096】

別の実施態様では、アレイを用いることにより、アレイにおける1個またはそれ以上の遺伝子の発現の時間推移をモニターすることが可能である。これは、本明細書で開示した様々な生物学的状況、例えば発生および分化、病気の進行、インビトロ過程、例えば細胞の形質転換および老化、自律神経および神経学的過程、例えば疼痛および本能的欲望、お

50

よび認知機能、例えば学習または記憶で行われ得る。

【0097】

アレイはまた、同一細胞または異なる細胞における他の遺伝子の発現に対する一遺伝子の発現の影響を確認するのにも有用である。これは、例えば最終または下流標的が調節され得ない場合に、治療的介入に関する代替的分子標的の選択対象を提供する。

【0098】

上記アレイはまた、正常および罹患細胞における1個またはそれ以上の遺伝子の示差的発現パターンを確認するのにも有用である。これは、診断または治療的介入に関する分子標的としての役割を果たし得る一群の遺伝子を提供する。

【0099】

タンパク質

さらに、ある種のタンパク質のレベル増加もまた、移植体に関する診断に役立つ情報を提供し得ることが予測される。ある実施態様では、表4、表5、表6、表7および表8の遺伝子によりコード化される1種またはそれ以上のタンパク質が検出され得、タンパク質レベルの上昇または減少が、移植拒絶の診断に使用され得る。好ましい実施態様では、タンパク質レベルを移植後流体試料で検出し、特に好ましい実施態様では、流体試料は、末梢血または尿である。別の好ましい実施態様では、タンパク質レベルは移植片生検材料から検出される。

【0100】

この明細書によると、タンパク質の検出方法は当業界では公知である。上記方法の例には、ウエスタン・ブロッティング、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）、一および二次元電気泳動、質量分析法および酵素活性の検出がある。適切な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、フラグメント（たとえばFabフラグメント）、1本鎖抗体および特異結合分子の他の形態が含まれ得る。

【0101】

予測医学

本発明は、診断的検定法、予後判定法、薬理遺伝学および臨床試験のモニタリングを予後（予知）目的に用いることにより、対象を診断し、予防的に処置する予知医学分野に関するものである。したがって、本発明の一つの態様は、試料（例、血液、血清、細胞、組織）からのバイオマーカータンパク質および/または核酸発現を測定することにより、対象が移植拒絶を起こす可能性があるか否かを測定する診断的検定法に関するものである。

【0102】

本発明の別の態様は、以下の項でさらに詳しく記載している臨床試験におけるバイオマーカーの発現または活性に対する作用物質（例、薬物、化合物）の影響のモニタリングに関するものである。

【0103】

試料中における本発明のバイオマーカータンパク質または遺伝子の存在または欠如を検出する方法の一例では、試験対象から試料を入手し、バイオマーカータンパク質または核酸の存在が試料から検出されるように、タンパク質またはバイオマーカータンパク質をコード化する核酸（例、mRNA、ゲノムDNA）を検出し得る化合物または作用物質と試料を接触させる。本発明のバイオマーカー遺伝子またはタンパク質に対応するmRNAまたはゲノムDNAを検出するのに好ましい作用物質は、本発明のmRNAまたはゲノムDNAとハイブリダイゼーションし得る標識核酸プローブである。本発明の診断的検定法での使用に適切なプローブを本明細書では記載している。

【0104】

バイオマーカータンパク質の検出に好ましい作用物質は、バイオマーカータンパク質に結合し得る抗体、好ましくは検出可能な標識を伴う抗体である。抗体は、ポリクローナル、さらに好ましくはモノクローナルであり得る。無傷の抗体、またはそのフラグメント（例、FabまたはF(ab')₂）が使用され得る。プローブまたは抗体に関する「標識（された）」の語は、プローブまたは抗体に検出可能な物質をカップリング（すなわち、

10

20

30

40

50

物理的結合)することによるプローブまたは抗体の直接的標識、および直接標識されている別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識を包含するものとする。間接的標識の例には、蛍光標識2次抗体を用いる1次抗体の検出およびビオチンでDNAプローブを末端標識することにより、それを蛍光標識ストレプトアビジンで検出させ得る方法がある。「試料」の語は、対象から単離した組織、細胞および生物学的流体、並びに対象内に存在する組織、細胞および流体を包含するものとする。すなわち、本発明検出方法は、インビトロおよびインビボで試料中におけるバイオマーカーmRNA、タンパク質またはゲノムDNAを検出するのに使用され得る。例えば、バイオマーカーmRNAのインビトロ検出技術には、ノーザン・ハイブリダイゼーションおよび *in situ* ハイブリダイゼーションがある。バイオマーカータンパク質のインビトロ検出技術には、酵素結合イム

10

【0105】

一実施態様において、試料は、試験対象からのタンパク質分子を含む。別法として、試料は、試験対象からのmRNA分子または試験対象からのゲノムDNA分子を含み得る。好ましい試料は、対象から慣用的手段により単離される血清試料である。

【0106】

さらに本方法では、対照対象から対照試料(例、健康な非移植腎臓または拒絶の徴候を全く示していない健康な移植腎臓からの生検材料)を入手し、バイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在が試料から検出されるように、バイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAを検出し得る化合物または作用物質と対照試料を接触させ、次いで対照試料中におけるバイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在を、試験試料中におけるバイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在と比較する。

20

【0107】

本発明はまた、試料におけるバイオマーカーの存在を検出するキットを包含する。例えば、キットは、試料中のバイオマーカータンパク質またはmRNAを検出し得る標識化合物または作用物質; 試料中のバイオマーカーの量を測定する手段; および試料中のバイオマーカーの量を標準と比較する手段を含み得る。化合物または作用物質は、適切な容器に包装され得る。さらにキットは、バイオマーカータンパク質または核酸を検出するためのキットの使用説明書を含み得る。

30

【0108】

さらに、本明細書記載の診断方法は、異常なバイオマーカー発現または活性に関連した疾患または障害を有するかまたは発症する危険がある対象の識別に使用され得る。本明細書で使用する「異常な」の語は、野生型バイオマーカー発現または活性から逸脱したバイオマーカー発現または活性を含む。異常な発現または活性は、増加または減少した発現または活性、および発現の野生型発生パターンまたは細胞レベル下の発現パターンに従わない発現または活性を含む。例えば、異常なバイオマーカー発現または活性は、バイオマーカー遺伝子における突然変異により、バイオマーカー遺伝子の過少発現または過剰発現が誘発される場合および上記突然変異が、非機能性バイオマーカータンパク質または野生型の流儀では機能しないタンパク質、例えばバイオマーカーリガンドと相互作用しないタンパク質または非バイオマーカータンパク質リガンドと相互作用するタンパク質をもたらす状況を含むものとする。

40

【0109】

さらに、本明細書記載の予後判定法は、対象に作用物質(例、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティック、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬剤候補)、例えば、シクロスポリンを投与することにより、拒絶の危険性を低減化させ得るか

50

否かを判定するのに使用され得る。すなわち、本発明は、対象が表4、表5、表6、表7および表8における遺伝子組合わせの遺伝子発現または活性の増加に随伴した疾患について作用物質により有効に処置され得るか否かを判定する方法を提供する。

【0110】

遺伝子の発現または活性に対する作用物質（例、薬剤）の影響のモニタリングは、基本的薬剤スクリーニングおよび臨床試験の両方で適用され得る。例えば、遺伝子発現、タンパク質レベルの増加、または活性のアプレギュレーションについての本明細書記載のスクリーニング検定法により決定される作用物質の有効性は、対象の臨床試験において作用物質で処置している間に現れる分子シグネチャーおよび分子シグネチャーの何らかの変化を調べることによりモニタリングされ得る。

10

【0111】

例えば、ただし限定するわけではないが、遺伝子活性をモジュレーションする作用物質（例、化合物、薬剤または小分子）での処置により細胞でモジュレーションされる遺伝子およびそれらのコード化タンパク質が同定され得る。臨床試験では、細胞を単離し、RNAを調製し、拒絶反応に伴う関係遺伝子の発現レベルについて分析し得る。遺伝子発現レベル（例、遺伝子発現パターン）は、本明細書に記載しているノーザンブロット分析またはRT-PCRにより、または別法として、本明細書記載の方法の一つにより、産生されたタンパク質の量を測定することにより定量化され得る。こうして、遺伝子発現パターンは、作用物質に対する細胞の生理学的応答を示す、分子シグネチャーとしての役割を果たし得る。したがって、この応答状態は、対象を作用物質で処置する前および処置している間の様々な時点で測定され得る。

20

【0112】

好ましい実施態様において、本発明は、作用物質（例、本明細書記載のスクリーニング検定法により同定されるアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティック、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬剤候補）による対象の処置の有効性をモニターする方法であって、(i)作用物質の投与前に対象から投与前試料を採取し、(ii)投与前試料における一遺伝子または遺伝子組合わせ、遺伝子によりコード化されたタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの発現レベルを検出し、(iii)対象から一つまたはそれ以上の投与後試料を入手し、(iv)投与後試料におけるバイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの発現または活性のレベルを検出し、(v)投与前試料におけるバイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの発現または活性のレベルを、投与後の一試料または複数試料における一遺伝子または遺伝子組合わせ、遺伝子によりコード化されたタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの場合と比較し、さらに(vi)その結果に応じて対象への作用物質の投与を改変する段階を含む方法を提供する。例えば、遺伝子の発現または活性を低レベルに低下させる、すなわち、移植拒絶から保護するため作用物質の有効性を高めるのには、作用物質の投与の増加が望ましいことであり得る。他方、バイオマーカーの発現または活性を検出されたレベルより低レベルに低下させる、すなわち作用物質の有効性を減少させる、例えば毒性を回避するのには、作用物質の投与の減少が望ましいことであり得る。上記の態様によると、遺伝子の発現または活性は、観察可能な表現型応答が存在しない場合でも、作用物質の有効性の指標として使用され得る。

30

40

【0113】

本発明は、移植拒絶阻止を目的とする予防および治療の両方法を提供する。予防および治療の両処置方法に関して、上記処置は、薬理遺伝学分野から得られた知識に基づいて特異的に調整または修正され得る。本明細書で使用している「薬理遺伝学」は、臨床開発中および市販されている薬剤へのゲノミクス技術、例えば遺伝子配列決定、統計的遺伝学、および遺伝子発現解析の適用を包含する。さらに具体的には、この語は、対象の遺伝子が薬剤に対する彼または彼女の応答（例、対象の「薬剤応答表現型」または「薬剤応答遺伝子型」）を如何にして決定するかの研究をいう。すなわち、本発明の別の態様は、対象の薬剤応答遺伝子型にしたがって、本発明のバイオマーカー分子またはバイオマーカーモジ

50

ュレーターにより対象の予防的または治療的処置を調整する方法に関するものである。薬理遺伝学により、臨床医学者または医師は、予防的または治療的処置を、その処置が非常に有益なものとなる対象にターゲティングし、毒性薬剤関連副作用を経験することになる対象の処置を回避することが可能となる。

【0114】

一態様において、本発明は、バイオマーカー発現をモジュレーションする化合物または作用物質を対象に投与することによる、バイオマーカー発現または活性の増加に関連した対象における移植拒絶の阻止方法を提供する。上記化合物または作用物質の例は、例えば免疫抑制特性を有する化合物または作用物質、例えば移植で使用される物質（例、カルシニューリン阻害剤、例えばシクロスポリンAまたはFK506）；mTOR阻害剤（例、ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン、CCI779、ABT578、AP23573、ピオリムス-7またはピオリムス-9）；免疫抑制特性を有するアスコマイシン（例、ABT-281、ASM981など）；コルチコステロイド類；シクロホスファミド；アザチオプリン；メトトレキサート；レフルノミド；ミゾリピン；ミコフェノール酸または塩；ミコフェノール酸モフェチル；15-デオキシスペルグアリンまたはその免疫抑制性相同体、類似体または誘導體；PKC阻害剤（例、国際公開第02/38561号または同第03/82859号に開示されている、実施例56または70の化合物）；JAK3キナーゼ阻害剤（例、N-ベンジル-3,4-ジヒドロキシ-ベンジリデン-シアノアセトアミド a-シアノ-(3,4-ジヒドロキシ)-]N-ベンジルシナマミド（チルホスチンAG490）、プロジギオシン25-C（PNU156804）、[4-(4'-ヒドロキシフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン]（WHI-P131）、[4-(3'-プロモ-4'-ヒドロキシフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン]（WHI-P154）、[4-(3',5'-ジプロモ-4'-ヒドロキシフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン]（WHI-P97、KRX-211、3-{(3R,4R)-4-メチル-3-[メチル-(7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-イル)-アミノ]-ピペリジン-1-イル}-3-オキソ-プロピオニトリルの遊離形態または医薬上許容される塩形態、例えばモノクエン酸塩（CP-690550とも呼ばれる）、または国際公開第04/052359号または国際公開第05/066156号に開示された化合物）；S1P受容体アゴニストまたはモジュレーター（例、所望によりリン酸化されていてもよいFTY720またはその類似体、例えば所望によりリン酸化されていてもよい2-アミノ-2-[4-(3-ベンジルオキシフェニルチオ)-2-クロロフェニル]エチル-1,3-プロパンジオールまたは1-{4-[1-(4-シクロヘキシル-3-トリフルオロメチル-ベンジルオキシイミノ)-エチル]-2-エチル-ベンジル}-アゼチジン-3-カルボン酸またはその医薬上許容される塩類）；免疫抑制性モノクローナル抗体（例、白血球受容体に対するモノクローナル抗体、例えばMHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD25、CD28、CD40、CD45、CD52、CD58、CD80、CD86またはそれらのリガンド）；他の免疫モジュレーター化合物（例、CTLA4またはその突然変異体の細胞外ドメインの少なくとも一部分、例えば非CTLA4タンパク質配列と結合されたCTLA4またはその突然変異体、例えばCTLA4 Ig（例えばATCC68629と称す）またはその突然変異体、例えばLEA29Yの少なくとも細胞外部分を有する組換え結合性分子）；接着分子阻害剤（例、LFA-1アンタゴニスト、ICAM-1または-3アンタゴニスト、VCAM-4アンタゴニストまたはVLA-4アンタゴニスト）である。また、これらの化合物または作用物質は併用され得る。

【0115】

本発明の別の態様は、治療目的のためにバイオマーカータンパク質の発現または活性をモジュレーションする方法に関するものである。したがって、本発明のモジュレーション方法の典型的実施態様では、細胞に関連するバイオマーカータンパク質活性の1つまたはそれ以上の活性をモジュレーションするバイオマーカータンパク質または作用物質と細胞を接触させる。バイオマーカータンパク質活性をモジュレーションする作用物質は、本明細

10

20

30

40

50

書記載の作用物質、例えば核酸またはタンパク質、バイオマーカータンパク質の天然に存する標的分子（例、バイオマーカータンパク質基質）、バイオマーカータンパク質抗体、バイオマーカータンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト、バイオマーカータンパク質アゴニストまたはアンタゴニストのペプチドミメティック、または他の小分子であり得る。一実施態様では、作用物質は、1つまたはそれ以上のバイオマーカータンパク質活性を刺激する。上記刺激性作用物質の例には、活性バイオマーカータンパク質および細胞に導入されたバイオマーカータンパク質をコード化する核酸分子がある。別の実施態様において、作用物質は、1つまたはそれ以上のバイオマーカータンパク質活性を阻害する。上記阻害性作用物質の例には、アンチセンスバイオマーカータンパク質核酸分子、抗バイオマーカータンパク質抗体、およびバイオマーカータンパク質阻害剤がある。これらのモジュレーション方法は、インピトロ（例、作用物質と共に細胞を培養することによる）または別法としてインピボ（例、対象への作用物質の投与による）で実施され得る。本発明自体は、バイオマーカータンパク質または核酸分子の異常な発現または活性を特徴とする疾患または障害に罹患した対象の処置方法を提供する。本方法の一実施態様では、バイオマーカータンパク質の発現または活性をモジュレーション（例、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーション）する作用物質（例、本明細書記載のスクリーニング検定法により同定される作用物質）または作用物質の組合わせを投与する。本方法の別の実施態様では、低下したか、または異常なバイオマーカータンパク質の発現または活性を補償するための治療としてバイオマーカータンパク質または核酸分子を投与する。

10

【0116】

20

バイオマーカータンパク質活性の刺激は、バイオマーカータンパク質が異常にダウンレギュレーションされている状況および/またはバイオマーカータンパク質活性の増加が有益な効果を有すると思われる状況では望ましい。例えば、バイオマーカータンパク質活性の刺激は、バイオマーカーがダウンレギュレーションされている状況および/またはバイオマーカータンパク質活性の増加が有益な効果を有すると思われる状況では望ましい。同様に、バイオマーカータンパク質活性の阻害は、バイオマーカータンパク質が異常にアップレギュレーションされている状況および/またはバイオマーカータンパク質活性の減少が有益な効果を有すると思われる状況では望ましい。

【0117】

本発明のバイオマーカータンパク質および核酸分子、並びに本明細書記載のスクリーニング検定法により同定されるバイオマーカータンパク質活性（例、バイオマーカー遺伝子発現）に対して刺激または阻害効果を及ぼす作用物質またはモジュレーターを対象に投与することにより、異常なバイオマーカータンパク質活性に随伴したバイオマーカー関連疾患（例、前立腺癌）が（予防的または治療的に）処置され得る。上記処置と関連して、薬理遺伝学（すなわち、対象の遺伝子型と外来化合物または薬剤に対する前記対象の応答の関係の研究）が考慮され得る。治療薬の代謝の差異は、薬理活性薬剤の用量と血中濃度との関係を改変することにより深刻な毒性または治療の失敗を誘発し得る。したがって、医師または臨床医学者は、バイオマーカー分子またはバイオマーカーモジュレーターを投与すべきかどうかを決定し、その用量および/またはバイオマーカー分子またはバイオマーカーモジュレーターによる処置の治療体制を調整する際に直接関連する薬理遺伝学研究で得られた知識を適用しながら考究すればよい。

30

40

【0118】

薬剤応答を予測する遺伝子の同定への薬理遺伝学的アプローチは、「全ゲノム関連解析」として知られ、主として既知遺伝子関連バイオマーカーから成るヒトゲノムの高解像度地図（例、ヒトゲノム上の60000~100000の多型または可変部位から成る「2対立遺伝子」遺伝子バイオマーカー地図、それぞれ2変異型を有する）に信頼を置くものである。上記の高解像度遺伝子地図を、II/III相薬剤治験に参加している統計的有意数の対象の各々のゲノムの地図と比較することにより、観察される特定薬剤応答または副作用に関連したバイオマーカーが同定され得る。別法として、上記の高解像度地図は、ヒトゲノムにおける1000万程度の既知一塩基多型（SNP）の組合わせから作成され得る

50

。本明細書で使用している「SNP」は、DNAの一伸長範囲において一ヌクレオチド塩基で起こる共通した変化である。例えば、SNPは、DNAの1000塩基ごとに1回起こり得る。SNPが病気の経過に関与している場合もあり得るが、疾患関連性の無いものが大多数であり得る。上記SNPの発生に基づいた遺伝子地図を考慮に入れれば、対象は、彼らの対象ゲノムにおけるSNPの特定パターンによって遺伝的範疇に分類され得る。この方法で、遺伝的類似対象間で共通したものであり得る特性を考慮に入れながら、上記の遺伝的類似対象の群に治療体制を適合させることが可能である。

【0119】

別法として、「候補遺伝子アプローチ」と呼ばれる方法が、薬剤応答を予測する遺伝子の同定に利用され得る。この方法によると、薬剤標的をコード化する遺伝子が既知の場合（例、本発明のバイオマーカータンパク質）、その遺伝子の共通した変異型は全て、母集団からかなり容易に同定され得ることから、ある遺伝子型に対して別の遺伝子型を有することが特定薬剤応答と関連しているか否かが測定され得る。

10

【0120】

複数の上記薬理遺伝学アプローチから得られる情報を用いることにより、対象の予防的または治療的処置に関して適切な用量および処置体制が決定され得る。この知識を投薬または薬剤選択に適用することにより、有害な反応または治療上の失敗が回避され得るため、バイオマーカー分子またはバイオマーカーモジュレーター、例えば本明細書記載の典型的スクリーニング検定法の一つにより同定されたモジュレーターで対象を処置する場合に治療または予防効率を高めることができる。

20

【0121】

以下、実施例により本発明についてさらに詳しく説明するが、限定的なものとはみなすべきではない。本明細書全体で引用した全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容については、出典明示により援用する。

【実施例】

【0122】

実施例1：慢性/硬化性同種移植腎症を予測するバイオマーカーの同定

1. 緒論および試験目的

生検組織の組織病理学的評価は慢性腎臓同種移植腎症(CAN)の診断についての最も信頼できる標準的手段であって、CANの兆候の予測は現時点では不可能である。遺伝子発現プロファイリングといった分子診断方法は、BANFF97疾病分類をさらに細かく分類する助けとなり得(Racusen LC, et al., *Kidney Int.* 55(2): 713-23 (1999))、また、他の手段では移植片機能不全がまだ検出され得ない移植後の早期時点で適用される場合には予測的または早期診断バイオマーカーとしても使用され得る。本試験では、移植後少なくとも約1年以内に移植片機能の明白な衰退を示さなかった患者、および06週目および12週目の生検材料ではなく24週目生検材料で明白な慢性同種移植腎症(CAN)と診断された患者からの連続腎臓プロトコル生検材料から抽出した生検RNAに遺伝子発現プロファイリングを適用した(図1参照)。具体的には、腎臓移植患者の腎臓生検材料から誘導したmRNA発現レベルに基づいた、慢性/硬化性同種移植腎症のゲノムバイオマーカーの同定により、同腎臓の組織病理学的検査がCANを診断し得ない時点での将来的なCANの早期検出/診断(予測)が可能となる。3種の分析法に従った:(1)TX後06週目(CANの組織病理学的診断の18週前)での早期診断(予測)に関するゲノムバイオマーカーの同定;(2)TX後12週目(CANの組織病理学的診断の12週前)での早期診断(予測)に関するゲノムバイオマーカーの同定;および(3)TX後06週目(CANの組織病理学的診断の18週前)またはTX後12週目(CANの組織病理学的診断の12週前)での早期診断(予測)、またはCAN対Nの診断のためのゲノムバイオマーカーの同定。

30

40

【0123】

1.1 患者層別化

全3時点での腎臓移植患者からの腎臓生検サンプルを分析した。この試験において、デ

50

ータセットは、67生検サンプルまたはこれらのサブセットを含んでいた。異なるグレードの慢性/硬化性同種移植腎症(CAN)全体におけるサンプル分布を下表3Aに示す。

表3A: 2つの臨床センターから補充した異なるグレードの疾患を伴うサンプル数
【表3】

CANのグレード	MHHからの患者数
0: 安定した移植片	33
0: 06週目: 潜在的 CAN	8
0: 12週目: 潜在的 CAN	8
I: 軽度	18
合計	67

10

【0124】

「正常」サンプルを、下記要領で以下の群に層別化した:

ソース: 全観測期間を通して腎臓同種移植片機能が安定している患者(生検サンプル数: 36)

ソース: 24週目の生検材料での診断によると、腎臓同種移植片機能が下降している患者;

TX後6週目(CANの組織病理学的徴候の18週前): 8サンプル

TX後12週目(CANの組織病理学的徴候の12週前): 8サンプル

20

【0125】

「CANグレード1」サンプルを、移植後任意の時点で患者から入手した。

表3B: 拒絶または腎症の臨床徴候が無い患者(N=12)および24週目で明白なCANを示す患者(N=8)からのデータの比較。

【表4】

CRM001-MHH 診断

患者数	06週目	12週目	24週目
→12	なし	なし	なし
1	なし	AR2=1A	なし
1	なし	AR1=ボーダーライン	なし
1	AR1=ボーダーライン	CAN 1=1(軽度)	なし
1	AR1=ボーダーライン	AR1=ボーダーライン	なし
→8	なし	なし	CAN 1=1(軽度)
2	なし	CAN 1=1(軽度)	CAN 1=1(軽度)
1	なし	AR1=ボーダーライン	CAN 1=1(軽度)
1	なし	AR1=ボーダーライン	CAN 1=1(軽度)
		CAN 1=1(軽度)	
1	CAN 1=1(軽度)	CAN 1=1(軽度)	CAN 1=1(軽度)
1	AR1=ボーダーライン	なし	CAN 1=1(軽度)
1	なし	AR1=ボーダーライン	AR2=1A
1	なし	CAN 1=1(軽度)	AR2=1A
1	なし	AR1=ボーダーライン	AR3=1B
1	なし	なし	AR2=1A CR 1= 1 (軽度)
1	なし	なし	AR3=1B CR 1= 1 (軽度)
1	なし	CAN 1=1(軽度)	AR1=ボーダーライン
			CR 1= 1 (軽度)
1	なし	CAN 1=1(軽度)	AR2=1A CR 1= 1 (軽度)

30

40

【0126】

50

2 サンプル処理

2.1 RNA抽出および精製

各冷凍組織片から酸性グアニジニウムチオシアネート - フェノール - クロロホルム抽出 (Trizol、Invitrogen Life Technologies) により全RNAを入手し、次いで全RNAを製造業者の使用説明書に従ってアフィニティー樹脂 (RNeasy、Qiagen) で精製し、定量化した。全RNAを $\lambda = 260 \text{ nm}$ での吸光度 ($A_{260 \text{ nm}}$) により定量化し、 $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ 比により純度を評価した。非変性アガロースゲル電気泳動によりRNA分子の完全性を確認した。RNAを分析時まで約 - 80 °C で貯蔵した。

【0127】

ジーンチップ (GeneChip) 実験

全DNAマイクロアレイ実験を、GeneChipシステムの製造業者 (Affymetrix Inc.、サンディエゴ、カリフォルニア、米国) の使用説明書に従って前記要領 (Lockhart DJ et al.、Nat Biotechnol. 14 (13) : 1675 - 80 (1996)) によりスイス国バーゼルの Genomics Factory EU で実施した。

【0128】

Trizol (Invitrogen Life Technologies、サンディエゴ、カリフォルニア、米国) を用いて酸性グアニジニウムチオシアネート - フェノール - クロロホルム抽出 (Chomczynski P et al.、Anal Biochem 162 (1) : 156 - 9 (1987)) により急速冷凍腎臓サンプルから全RNAを入手し、製造業者の使用説明書に従ってアフィニティー樹脂カラム (RNeasy ; Qiagen、ヒルデン、ドイツ国) で精製した。54000を超えるプローブセットを含み、28000以上の十分に実証されたヒト遺伝子からの35000を超える転写物および変異型を分析する、ヒトHG__133__plus2__標的アレイ [Affymetrix] を用いた。一組織、一動物につき一つのGeneChipを用いた。得られた画像ファイル (.dat ファイル) を、マイクロアレイ・アナリシス・スイート5 (MAS5) ソフトウェア (Affymetrix) を用いて処理した。シグナル強度 (シグナル) および絶対的発現レベル測定値 (絶対コール) に関するデータを含むタブ区切りしたファイルを得た。150の「標的強度」を用いて、未処理データを発現レベルに変換した。電子データベースへアップロードする前にデータを品質についてチェックした。

【0129】

2.3 データ解析

Silicon Genetics ソフトウェアパッケージGeneSpring バージョン7.2およびスウェーデン国Umetrics ABによる SIMCA-P+ (バージョン11) を用いて、データ解析を実施した。

【0130】

2.3.1 フィルタリング、解釈

これらのソフトウェアパッケージにおける様々なフィルタリングおよびクラスタリングツールを用いて、データセットを探索し、細胞および組織機能の改変を知らせ、化合物の作用方式に関する作業仮説を確立するのに使用され得る転写物レベルの変化を識別した。

【0131】

実験的なマイクロアレイ全域にわたる強度の変動を説明するため、各アレイに関する全測定結果をそのアレイの50パーセント点で割ることによりそれらを正規化した。さらに、各遺伝子に関する発現値を対照群におけるその遺伝子についてのメディアン発現値で割ることによりそれらを正規化した。

【0132】

様々なバイオマーカーを同定するため、種々のフィルターを適用したが、各バイオマーカーについては別々に記載している。これらのデータの情報は、多様な変化と生物学的情報を兼備したものであり、データと様々なデータベースおよび科学文献を比較することによりそれを評価した。幾つかのデータベース、例えば PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、N I H David (<http://david.niaid.nih.gov>)、Affymetrix (<https://www.affymetrix.com>)、および内部データベースなどを用いて、データセットの生物学的関連

10

20

30

40

50

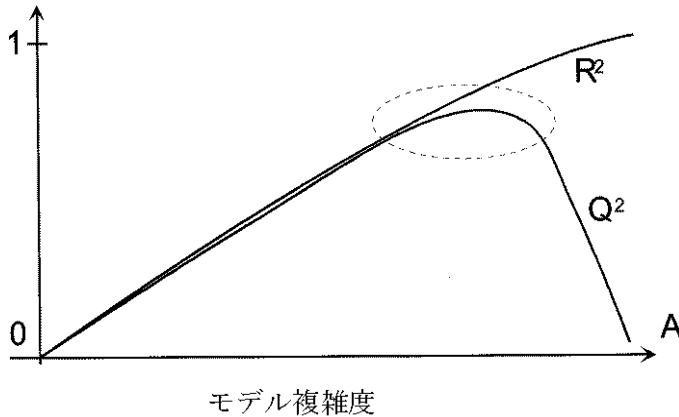
性を探索した。その関係の値は分析者により評価され、この分析から組み立てられた仮説は、他の分析および実験技術によるさらなる確認を必要とする。

【0133】

2.3.2 予測モデリングおよび確認技術

適合度 (R^2) と予測精度 (Q^2) 間のトレードオフを最小限にするという難題に取り組んだ。

【表5】



10

正規化発現値を対数変換し、パレトスケールした。予測モデルの中には、データが直交シグナル補正を受ける場合もあった。部分最小二乗法 (PLS) を教師あり学習アルゴリズムとして用いた。

20

【0134】

2.3.3 部分最小二乗法による教師あり学習

部分最小二乗法 (PLS) は、問題点が変数の予測であり、非常に多数の相関予測変数が存在するときの卓越した方法の一つである。多重共線性および観測値よりもかなり多数の変数があるときには、最善の統計的予測アプローチの一つであると思われる。

【0135】

PLS 回帰の目標は、一連の応答変数 Y と一連の予測変数 X とを関連付けたい状況における次元縮小戦略を提供することである。我々は、直交 X 成分 $t_h = X w_h^*$ および t_h および u_h 間の共分散を最大にする Y 成分 $u_h = Y c_h$ を求めた。それは、 X および Y の主成分分析および X および Y の正準相関分析間の妥協点であった。ただし、観測結果よりもさらに多くの予測変数 (cDNA クローン) があるため、正準相関分析または多変量回帰は直接適用され得なかったものとする。さらに、発現レベルのサブセットが選択された場合でさえ、マイクロアレイデータにより観察される多重共線性が高いことにより、多変量回帰および正準分析の分析能力は不十分なものとなる。対照的に、PLS 方法は、マイクロアレイデータによる場合のように (Perez-Enciso M et al., Human Genetics 112 (5-6): 581-92 (2003))、観測結果よりも多くのさらなる予測変数が存在する場合でさえ適用可能である。PLS-DA の特定のケースは、 Y が X に関するカテゴリ変数のカテゴリを描く一連の 2 値変数である、すなわち数依存的または応答変数がカテゴリの数に等しい PLS 回帰である。別の判別戦略は、Nguyen および Rocke (Nguyen DV et al., Bioinformatics 18: 39-50 (2002)) により報告されている。各応答変数 y_k について、 X 成分に関する回帰モデルが記載されている：

30

40

【数1】

$$y_k = \sum_{h=1}^m (X w_h^*) c_h + e = X W^* c + e,$$

[式中、 w_h^* は、 k 番目成分においてもとの各変数に与えられた重みを含む p 次元ベクトルであり、 c_h は、 h 番目 X 成分変数に関する y_k の回帰係数である]

我々は、Wold et al. (Wold et al., The multivariate calibration problem in chemis

50

try solved by the PLS method, Ruhe A, Kagstrom B (編) Proc Conf Matrix Pencils, Springer、ハイデルベルグ、286 - 293 頁 (1983)) により開発された欠測値を見込むアルゴリズムを使用した。PLSで意味のある答を得るための基本的必要条件は、ある程度の予備的な変数選択である。我々は、各変数に関するVIPに基づいて変数を選択することによりこれを行った。VIPは、PLS文献における平易な尺度であり、以下の通り変数 j について定義される：

【数2】

$$VIP_j = \left\{ p \sum_{h=1}^m \sum_k R^2(y_k, t_h) w_{hj}^2 / \sum_{h=1}^m \sum_k R^2(y_k, t_h) \right\}^{1/2}, \quad 10$$

(Eriksson L, et al., Umetrics, Umea (1999) ; (Tenenhaus M, La regression PLS. Editions Technip, Paris (1998)) (各 j 番目予測変数 $j = 1, p$ について)、式中、 $R^2(a, b)$ は、ベクトルのアイテム a および b 間の相関の平方を表し、 $t_h = X_{h-1} w_h$ 、式中、 X_{h-1} は、成分 $t_1 \dots t_{h-1}$ についての X の回帰における残差行列であり、 w_h はノルム1のベクトルである (PLS回帰アルゴリズムにおいて、 t_h はこの正規化に制約されて立てられる)。ただし、

【数3】

w_{jh}^2
は、 h 番目 PLS 成分への各変数 j の寄与度を測定する。すなわち、 VIP_j は、モデルの総平方和に対し、全成分にわたって総計した各変数の応答およびカテゴリー応答 (Y における2つを超えるカテゴリーについて) に対する影響を定量化する。これによって、VIPは各 cDNA クローンのグローバル効果の直観的に魅力のある尺度となる。VIPはまた。

【数4】

$$\sum_{j=1}^p VIP_j^2 = p$$

のプロパティを有する。

【0136】

この作業では、全変数 (cDNA レベル) により第1分析を実施し、VIPを各変数について評価した。新成分が Q^2 基準を満たす場合、PLS成分の数を選択した：すなわち

【数5】

$$Q_h^2 = 1 - PRESS_h / RESS_{h-1} \geq 0.05,$$

[式中、 $PRESS_h$ は、 h 成分を含むモデルの予測平方和であり、 $RESS_{h-1}$ は、 $h-1$ 成分を含むモデルの残差平方和である]。PRESSは、クロスバリデーションにより計算される、

【数6】

$$PRESS_h = \sum_{i=1}^n (y_{h-1,i} - \hat{y}_{h-1,-i})^2, \quad 40$$

(ただし、 $h-1$ 成分を当てはめるとき、 $y_{h-1,i}$ は実測値 i の残差であり、

【数7】

$$\hat{y}_{h-1,-i}$$

は、 i 番目の実測値を除いたときに得られる予測 y_i である)。新たな実測値の予測は、単に

【表 6】

$$\hat{y}_i = \sum_{h=1}^m (x_i' u_h^*) c_h$$

(式中、 x_i は、新たな実測値 i に関する変数記録を含むベクトルである) として得られる。

【0137】

モデルバリデーションを並べ替えにより実施した。並べ替え検定は、その柔軟性およびコンピューター性能の増大ゆえに近年非常に人気の出てきたコンピューター集約技法の一部である (Good PI, PERMUTATION TESTS: A PRACTICAL GUIDE TO RESAMPLING METHODS FOR TESTING HYPOTHESES. Springer、ニューヨーク)。原理は非常に単純なもので、所与のサンプルにおける統計値 T の有意性を試験するため、応答ベクトル (Y) を N 回ランダム化し、 T_i 、 $i = 1, N$ を並べ替えセットのそれぞれについて計算し、帰無仮説下での T の分布を一連の T_i 値により概算する; 例えば、5% 有意性最低水準は、全 T_i の $0.05 \times N$ 最大値となる。本例では、応答ベクトル (Y) を 200 回並べ替え、分析を再び実施し、 Q^2 および R^2 の値をプロットした、

【数 8】

$$Q^2 = 1 - \prod_{h=1}^m \text{PRESS}_h / \text{RESS}_{h-1}$$

および R^2 は、モデルにより説明される総平方和の分数である。 Q^2 はモデルの予測能力の尺度であり、 R^2 はモデルの適合度と関連している。SIMCA - P ソフトウェア (Eriksson L, et al., Umetrics, Umea (1999)) により分析を行った。

【0138】

3 結果

3.1 移植後 06 週目のバイオマーカー

3.1.1 戦略

腎臓移植 (「TX」) 後少なくとも 12 カ月まで移植片機能が安定している 12 患者から TX 後 6 週目に採取した腎臓同種移植生検サンプルの遺伝子発現プロフィールを、24 週目で腎臓移植片機能が低下しており、組織病理学的に CAN の診断が下された 8 患者の場合と比較した。重要なことに、06 週目の時点で、この試験における生検材料は全て安定していると診断された。

【0139】

3.1.2 データ処理

MAS5 変換データを各マイクロアレイの 50 パーセント点に正規化し、次いでハイブリダイゼーションのバッチにしたがって (GeneSpring バージョン 7.2)、移植片機能が安定している患者からの全正常サンプルのメディアンに基づいて正規化した。1 患者群当たりの遺伝子発現強度をトリム平均 (Tmean) として計算し、上位および下位発現範囲に対しては外れ値サンプルとした (Windows Excel 2002)。変動係数 (CV) を一群の発現範囲の 20 および 80 パーセント点の差分の 6 順位として計算し、その群の Tmean のパーセンテージとして表した。腎臓同種移植片が長期間安定していた患者からのサンプルの群において変動係数 (CV) が 20% より小さい遺伝子のみをさらなる分析に含ませた。次いで、これらの遺伝子を以下の基準によりフィルタリングした:

- (1) 2 群のいずれかにおいて $Tmean > 100$
- (2) t 検定 (両側検定、等分散性) の p -値 < 0.05
- (3) 2 群の Tmean 間の変化率 > 1.2

このフィルターにより 188 プロブセットを得た。

【0140】

正規化データを予測モデリングおよびバリデーション技術 (2.3.2、2.3.3 項) にかけることにより、このデータセットについて最善のモデルを同定した。

【 0 1 4 1 】

3.1.3 バイオマーカー・TX後06週目(「N2-前CAN」対「N」)、結果本例では、49のプローブセットが、正しい群への各サンプルの帰属関係を予測するのに十分かつ必要であると認識された。

【 0 1 4 2 】

図2は、バイオマーカー・06週、PLS-DAモデルの散布図である。

散布図または散布グラフは、それぞれ水平軸および垂直軸に座標をもつ有限的な多くの点のみを示すことにより2セットの関連した量的または数的データを視覚的に表示および比較するために統計で使用されるグラフである。図2において、各ドットは患者のサンプルを表す。データポイント間の相対的距離は、関連性/類似性の尺度である。「前CAN」サンプルからの「N」サンプルの分離は、49プローブセットの使用によりデータポイント間を判別するアルゴリズム/モデルの有効性を示す。

10

【 0 1 4 3 】

図3は、バイオマーカー・06週PLS-DAモデルについての実測データ対予測データを比較するグラフである。

【 0 1 4 4 】

Y空間サンプルの予測は、散布図としてプロットされ得る。RMSE(標準誤差)は、予測残差(誤差)の標準偏差であり、 $(\sum(\text{実測値} - \text{予測値})^2 / N)$ の平方根として計算される。小RMSEは、モデルの適合度の尺度である。プロットのY軸は、モデルの実測クラスを表し、X軸は、予測クラスを表す。このプロットにおけるY値およびX値のマッチは、モデルの適合度を立証する。

20

【 0 1 4 5 】

図4は、バイオマーカー・06週PLS-DAモデル:「応答並べ替えによるバリデーション」を示す。応答並べ替えによるバリデーションは、サンプルのトレーニングセットおよび試験セットを作成する内部クロスバリデーションである。モデルを適合させることにより、トレーニングセットに基づいて試験セットを説明し、 $R^2 Y$ (被説明分散)および Q^2 (予測分散)についての値を計算し、プロットする。トレーニングおよび試験セットの無作為並べ替えにより、若干の $R^2 Y / Q^2$ が得られる。次いで、「実際の」ものを含む全モデルの $R^2 Y / Q^2$ 値をY軸で表し、X軸を並べ替えた応答変数およびもとの応答変数間の相関係数に割り当てることにより、バリデーションプロットを作成する。次いで、回帰直線を $R^2 Y$ ポイント間に当てはめ、 Q^2 ポイントを通してもう1本を当てはめる。回帰直線の切片は、データを当てはめるため得られた「バックグラウンド」 $R^2 Y$ および Q^2 の尺度として解釈され得る。切片が $R^2 Y$ については0.4前後およびそれ未満および Q^2 については0.05前後およびそれ未満であれば有効なモデルを示す。このモデルではこれらの基準が満たされるため、それは、本データセットについて有効なモデルの指標である。

30

【 0 1 4 6 】

組織移植6週後の分子シグネチャーを形成するバイオマーカー遺伝子の組合わせを表4に示す。安定した移植片は、当然移植後のいかなる時点でもCANを発症しない患者からのサンプル群の群値を描いており、「ベースライン」レベルでの遺伝子の発現レベルを示す。

40

表4: バイオマーカー・06週、PLS-DAモデルの遺伝子

【表 7】

Affymetrix プローブセッ ト ID	説明	一般名	Genbank	変化率	安定移植片： 未処理発現値
221657_s_a t	アンキリン反復および SOCS box-含有6	ASB6	BC001719	0.72	127
224489_at	ARF タンパク質	LOC51326	BC006271	1.52	74
213710_s_a t	カルモジユリン 1 (ホスホラセキナ ーゼ, テルタ)	CALM1	AL523275	1.53	142
1558404_at	CDNA FLJ41173 fis, クローン BRACE2042394		BC015390	0.78	174
201183_s_a t	クロモトメインヘリカーゼ DNA結 合タンパク質4	CHD4	AI613273	0.74	364
222809_x_a t	染色体 14 読み枠136	C14orf13 6	AA728758	1.38	155
222492_at	染色体 21 読み枠124	C21orf12 4	AW262867	0.62	169
227188_at	染色体21 読み枠63	C21orf63	AI744591	1.51	243
224991_at	c-Maf-誘導タンパク質	CMIP	AI819630	0.63	82
223495_at	超らせんドメイン含有 8	CCDC8	AI970823	0.64	351
239860_at	ジヒトドレリミジナーゼ	DPYS	AI311917	0.66	143
212728_at	ディスク, 大相同体3 (神経 内分泌-dlg, ショウショウハエ (Drosophila))	DLG3	T62872	0.74	113
225167_at	FERM ドメイン含有4	FRMD4	AW515645	0.63	254
236656_s_a t	完全長挿入体 cDNA YI 37C01		AW014647	1.34	276
213645_at	gb:AF305057 /DB_XRE F=gi:11094017 /FEA= DNA_1 /CNT=29 /TID= Hs.180433.1 /TIER=S tack /STK=12 /UG=Hs .180433 /LL=55556 / UG_GENE=HSRTSBETA / UG_TITLE=rTS ヘータンハ ク質 /DEF=ホモサヒェンス R TS (RTS) 遺伝子, 完全c ds, オルターナティブスプライシング		AF305057	1.39	387

10

20

30

40

【表 8】

231951_at	グアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gプロテイン), アルファ活性化活性ポリペプチド0	GNA01	AL512686	1.55	81
203394_s_at	hairy and enhancer of split 1, ショウジョウバエ (Drosophila)	HES1	BE973687	0.72	618
241031_at	仮定的 LOC145741		BE218239	0.78	80
223542_at	仮定的タンパク質 DKFZp761C121	DKFZp761C121	AL136560	0.71	74
215063_x_at	仮定的タンパク質 FLJ20331	FLJ20331	AL390149	0.76	136
226485_at	仮定的タンパク質 FLJ20674	FLJ20674	BG547864	0.71	278
230012_at	仮定的タンパク質 FLJ34790	FLJ34790	AW574774	1.39	102
1557207_s_at	仮定的タンパク質 LOC283177	LOC283177	AI743605	0.72	152
225033_at	仮定的タンパク質 LOC286167	LOC286167	AV721528	1.36	160
231424_at	仮定的タンパク質 MGC52019	MGC52019	AV700405	2.08	351
224525_s_at	仮定的タンパク質 PTD004	PTD004	AL136546	1.63	78
209291_at	DNA結合4の阻害剤, 優性抑制型ヘリックスループ-ヘリックスタンパク質	ID4	AW157094	1.53	1689
228002_at	イソペンテニル-ニリン酸デルタイソメラーゼ 2	IDI2	AI814569	1.44	104
231850_x_at	KIAA1712	KIAA1712	AB051499	0.71	104
229095_s_at	LIM および老化細胞抗原様ドメイン3		AI797263	1.83	135
229874_x_at	LOC388599 (LOC388599), mRNA		BE865517	0.70	710

10

20

30

40

【表 9】

213215_at	MRNA 完全長挿入体cDNA クローン EUROIMAGE 42138		AI910895	1.57	246
226991_at	活性化T細胞の核因子, 細胞質, カルシニューリン-依存的2		AA489681	0.68	92
203195_s_at	ヌクレオポリン 98kDa	NUP98	NM_005387	0.78	109
218414_s_at	nudE 核分布遺伝子 E 相同体1 ラン藻(A.nidulans)	NDE1	NM_017668	1.89	178
206302_s_at	nudix (ヌクレオシド ニリン酸結合部分X)-型モチーフ 4	NUDT4	NM_019094	0.73	934
203118_at	プロタンパク質変換酵素サチライシン/ケキシントタイプ 7	PCSK7	NM_004716	0.77	170
203555_at	タンパク質チロシンホスファターゼ, 非受容体タイプ18 (脳由来)	PTPN18	NM_014369	2.39	83
238863_x_at	環状フィンガータンパク質 135	RNF135	AI524240	0.70	87
215127_s_at	RNA 結合モチーフ, 1本鎖相互作用性タンパク質 1	RBMS1	AL517946	2.62	2152
207939_x_at	RNA 結合タンパク質 S1, 高セリンドメイン	RNPS1	NM_006711	0.63	149
211325_x_at	RPL13-2偽遺伝子	LOC283345	U72518	0.73	110
225779_at	溶質担体ファミリー 27 (脂肪酸輸送体), 構成員 4	SLC27A4	AK000722	1.32	85
235579_at	スプライシング因子, 高アルギニン/セリン 2, 相互作用性タンパク質	SFRS2IP	AA679858	1.67	122

10

20

30

【表 10】

1316_at	甲状腺ホルモン受容体, アルファ(赤芽球性白血 病ウイルス性(v-erb-a)発癌遺伝子相合体, 鳥 由来)	THRA	X55005mRN A	2.47	115
242536_at	転写配列		AI522220	2.21	526
244018_at	転写配列		AW451618	1.44	66
244026_at	転写配列		BF063657	1.46	71
243514_at	WD 反復およびFYVE ド メイン含有2	WDFY2	AI475902	1.75	70

10

【0147】

一実施態様において、6週目に同定された好ましい遺伝子には、NFAT (Murphy et al., (2002) J. Immunol 10 / 1 ; 169 (7) : 3717 - 25)、ディスク・ラージ3、d1g3 (Hanada et al. (2000) Int. J. Cancer 5 / 15 ; 86 (4) : 480 - 8)、および甲状腺ホルモン受容体アルファ (Sato et al., Circ Res. (2005) 9 / 16 ; 97 (6) : 550 - 7、Epub 2005年8月11日)があるが、これらに限定されるわけではない。

20

【0148】

3.2 バイオマーカー・移植後12週

3.2.1 戦略

腎臓TX後少なくとも12カ月まで移植片機能が安定している12患者からTX後12週目に採取した腎臓同種移植生検サンプルの遺伝子発現プロフィールを、24週目で腎臓移植片機能が低下しており、組織病理学的にCANの診断が下された8患者の場合と比較した。重要なことに、12週目の時点で、この試験における生検材料は全て安定していると診断された。

【0149】

3.2.2 データ処理

MAS5変換データを各マイクロアレイの50パーセント点に正規化し、次いでハイブリダイゼーションのバッチにしたがって (GeneSpringバージョン7.2)、移植片機能が安定している患者からの全正常サンプルのメディアンに基づいて正規化した。1患者群当たりの遺伝子発現強度をトリム平均 (Tmean) として計算し、上位および下位発現範囲に対しては外れ値サンプルとした (Windows Excel 2002)。変動係数 (CV) を一群の発現範囲の20および80パーセント点の差分の6順位として計算し、その群のTmeanのパーセンテージとして表した。腎臓同種移植片が長期間安定していた患者からのサンプルの群において変動係数 (CV) が20%より小さい遺伝子のみをさらなる分析に含ませた。次いで、これらの遺伝子を以下の基準によりフィルタリングした：

30

(1) 2群のいずれかにおいて $Tmean > 100$ (2) t検定 (両側検定、等分散性) の $p - 値 < 0.05$ (3) 2群のTmean間の変化率 > 1.5

40

このフィルターにより664プローブセットを得た。正規化データを予測モデリングおよびバリデーション技術にかけることにより (2.3.2、2.3.3項)、このデータセットについて最善のモデルを同定した。

【0150】

3.2.3 バイオマーカー・TX後12週：OPLSモデル、結果

図5は、バイオマーカー・12週OPLSモデル：散布図を示す。

散布図または散布グラフは、それぞれ水平軸および垂直軸に座標をもつ有限的な多くの点のみを示すことにより2セットの関連した量的または数的データを視覚的に表示および比

50

較するために統計で使用されるグラフである。図5において、各ドットは患者のサンプルを表す。データポイント間の相対的距離は、関連性/類似性の尺度である。「前CAN」サンプルからの「N」サンプルの分離は、これらのプロブセットの使用によりデータポイント間を判別するアルゴリズム/モデルの有効性を示す。

【0151】

図6は、バイオマーカー・12週OPLSモデル:「応答並べ替えによるバリデーション」を示す。応答並べ替えによるバリデーションは、サンプルのトレーニングセットおよび試験セットを作成する内部クロスバリデーションである。モデルを適合させることにより、トレーニングセットに基づいて試験セットを説明し、 $R^2 Y$ (被説明分散) および Q^2 (予測分散) についての値を計算し、プロットする。トレーニングおよび試験セットの無作為並べ替えにより、若干の $R^2 Y / Q^2$ が得られる。次いで、「実際の」ものを含む全モデルの $R^2 Y / Q^2$ 値をY軸で表し、X軸を並べ替えた応答変数およびもとの応答変数間の相関係数に割り当てることにより、バリデーションプロットを作成する。次いで、回帰直線を $R^2 Y$ ポイント間に当てはめ、 Q^2 ポイントを通してもう1本を当てはめる。回帰直線の切片は、データを当てはめるため得られた「バックグラウンド」 $R^2 Y$ および Q^2 の尺度として解釈され得る。切片が $R^2 Y$ については0.4前後およびそれ未満および Q^2 については0.05前後およびそれ未満であれば有効なモデルを示す。このモデルではこれらの基準が満たされるため、それは、本データセットについて有効なモデルの指標である。

10

【0152】

図7は、バイオマーカー・12週OPLSモデル:実測対予測を示す

Y空間サンプルの予測は、散布図としてプロットされ得る。 $RMSE$ (標準誤差) は、予測残差 (誤差) の標準偏差であり、 $(\text{実測値} - \text{予測値})^2 / N$ の平方根として計算される。小 $RMSE$ は、モデルの適合度の尺度である。プロットのY軸は、モデルの実測クラスを表し、X軸は、予測クラスを表す。このプロットにおけるY値およびX値のマッチは、モデルの適合度を立証する。

20

【0153】

OPLS分析により測定された組織移植後12週目の分子シグネチャーを形成するバイオマーカーの組合わせを表5に示す。

表5: バイオマーカー・12週OPLSモデルの遺伝子

30

【表 1 1】

Affymetrix プローブセッ トID	説明	一般名	Genbank	変化率	安定移植 片:未処理 発現値
201792_at	AE 結合タンパク質 1	AEBP1	NM_001129	2.13	212
211712_s_at	アネキシン A9	ANXA9	BC005830	0.47	190
207367_at	アデノシントリホスファ ターゼ, H+/K+輸送性, 非 胃性, アルファポリペプ チド	ATP12A	NM_001676	0.48	108
233085_s_at	AV734843 cdA ホモサピ エンスcdNA クローンcdA AHD10 5', mRNA 配列.	FLJ22833	AV734843	2.13	368
227140_at	CDNA FLJ11041 fis, ク ローン PLACE1004405		AI343467	1.95	105
232090_at	CDNA FLJ11481 fis, ク ローン HEMBA1001803		AI761578	1.89	102
232991_at	CDNA FLJ11613 fis, ク ローン HEMBA1004012		AK021675	1.96	101
1570198_x_at	クローンIMAGE:5111803, mRNA		BC019872	2.23	131
229218_at	コラーゲン, タイプI, ア ルファ 2	COL1A2	AA628535	4.04	212
232458_at	コラーゲン, タイプIII, アルファ1(エーレルス- ダンロー症候群タイプIV , 常染色体 優性)		AU146808	0.50	66
201438_at	コラーゲン, タイプVI, ア ルファ3	COL6A3	NM_004369	8.84	1146
226237_at	コラーゲン, タイプVIII, アルファ 1	COL8A1	AL359062	2.00	471
227336_at	deltex 相同体1 ショウ ジョウバエ(Drosophila)	DTX1	AW576405	0.42	125

10

20

30

40

【表 1 2】

210165_at	デオキシリボヌクレアーゼ I	DNASE1	M55983	0.55	189
220625_s_at	E74-様因子5 (ets ドメイン転写因子)	ELF5	AF115403	2.26	405
221870_at	EH-ドメイン含有2	EHD2	AI417917	1.71	55
227353_at	ゆう贅状表皮発育異常症2	EVER2	BE671663	2.42	70
242974_at	frizzled 相同体9ショウジョウバエ(Drosophila)	FZD9	AA446657	2.49	50
211795_s_at	FYN 結合タンパク質 (FYB-120/130)	FYB	AF198052	0.40	89
1560782_at	ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:5186324, 部分的 cds.		BC035326	2.69	112
242372_s_at	仮定的 タンパク質 DKFZp761N1114	DKFZp761N1114	AL542291	2.52	329
222872_x_at	仮定的 タンパク質 FLJ22833	FLJ22833	AU157541	1.94	400
224489_at	仮定的 タンパク質 LOC284058	LOC51326	BC006271	0.45	94
212768_s_at	イソ型1マッチ:タンパク質: Sw:Q07081 Tr:095362 Tr:Q9Z2Y4 Tr:095897 Tr:070624 Sw:Q99972 Sw:Q99784 Sw:Q62609 Tr:Q9TV76 Tr:Q9I9K5 Sw:P01813 Tr:Q9IAK4 Tr:035429;染色体13でのクローンRP11-209J19からのヒトDNA配列は、EST, STSおよびGSSを含む。2つのイソ型(GW112およびKIAA4294)をもつGW112タンパク質についての遺伝子を含む, 完全配列.	GW112	AL390736	2.40	143

10

20

30

40

【表 1 3】

201744_s_at	ルミカン	LUM	NM_002345	2.22	1658
229554_at	ルミカン	LUM	AI141861	2.05	82
227438_at	リンパ球アルファ-キナーゼ	LAK	AI760166	2.34	55
226841_at	マクロファージ発現遺伝子 1	MPEG1	BF590697	2.17	81
212999_x_at	主要組織適合性遺伝子複合体, クラスII, DQベータ 1	HLA-DQB1	AW276186	2.00	101
226210_s_at	母系発現 3	MEG3	AI291123	2.43	127
212012_at	メラノーマ関連遺伝子	D2S448	BF342851	0.50	428
219666_at	膜貫通性4-ドメイン, サブファミリー A, 構成員 6A	MS4A6A	NM_022349	3.20	157
232113_at	MRNA; cDNA DKFZp564B182 (クローン DKFZp564B182 から)		N90870	3.00	158
1556183_at	MRNA; cDNA DKFZp686E124 6 (クローン DKFZp686E1246から)		AK097649	1.93	47
228055_at	ナプシンB 偽遺伝子	NAP1L	AI763426	0.52	99
229070_at	ne10a12.s1 NCI_CGAP_Co3 ホモサピエンスcDNA クローン IMAGE:880798 3', mRNA配列.	C6orf105	AA470369	2.43	210
214111_at	オピオイド結合タンパク質/細胞接着分子-様	OPCML	AF070577	2.67	103
205267_at	POU ドメイン, クラス2, 会合因子 1	POU2AF1	NM_006235	2.18	39

10

20

30

【表 1 4】

216834_at	G-プロテインシグナリン グ1の調節因子	RGS1	S59049	1.98	36
218870_at	Rho GTPアーゼ活性化タン パク質 15	ARHGAP15	NM_018460	2.79	56
237639_at	SRSR846		AI913600	1.92	372
209374_s_at	シノニム: MU;ホモサピエ ンス免疫グロブリン重定 常 mu, mRNA (cDNA クロ ーン MGC:1228 IMAGE:354 4448), 完全cds.	IGHM	BC001872	2.07	84
236203_at	te62a03. x1 Soares_NFL_T _GBC_S1ホモサピエンス c DNA クローン IMAGE:2091 244 3',gb:J02931 組織因 子前駆体 (ヒト)と類似:, mRNA 配列.		AI377755	2.84	51
203083_at	トロンボスポンジン 2	THBS2	NM_003247	0.42	403
244061_at	転写配列		AI510829	0.45	32
209960_at	不特定タンパク質産物: H GF (AA 1-728); 肝細胞増 殖因子についてのヒトmRN A (HGF).	HGF	X16323	2.46	119
202664_at	ヴィスコット-オールドリ ッチ症候群タンパク質相 互作用性タンパク質	WASPIP	AW058622	2.71	385

10

20

30

【 0 1 5 4 】

3.2.4 バイオマーカー・TX後12週(「N1-前CAN対N」):PLSDAモデル、結果

図8は、バイオマーカー・12週PLSDAモデル:散布図を示す。散布図または散布グラフは、それぞれ水平軸および垂直軸に座標をもつ有限的な多くの点のみを示すことにより2セットの関連した量的または数的データを視覚的に表示および比較するために統計で使用されるグラフである。図8において、各ドットは患者のサンプルを表す。データポイント間の相対的距離は、関連性/類似性の尺度である。「前CAN」サンプルからの「N」サンプルの分離は、これらのプロブセットの使用によりデータポイント間を判別するアルゴリズム/モデルの有効性を示す。

40

【 0 1 5 5 】

図9は、バイオマーカー・12週PLSDAモデル:「応答並べ替えによるバリデーション」を示す。応答並べ替えによるバリデーションは、サンプルのトレーニングセットおよび試験セットを作成する内部クロスバリデーションである。モデルを適合させることにより、トレーニングセットに基づいて試験セットを説明し、 $R^2 Y$ (被説明分散)および Q^2 (予測分散)についての値を計算し、プロットする。トレーニングおよび試験セット

50

の無作為並べ替えにより、若干の $R^2 Y / Q^2$ が得られる。次いで、「実際の」ものを含む全モデルの $R^2 Y / Q^2$ 値を Y 軸で表し、X 軸を並べ替えた応答変数およびもとの応答変数間の相関係数に割り当てることにより、バリデーションプロットを作成する。次いで、回帰直線を $R^2 Y$ ポイント間に当てはめ、 Q^2 ポイントを通してもう 1 本を当てはめる。回帰直線の切片は、データを当てはめるため得られた「バックグラウンド」 $R^2 Y$ および Q^2 の尺度として解釈され得る。切片が $R^2 Y$ については 0.4 前後およびそれ未満および Q については 0.05 前後およびそれ未満であれば有効なモデルを示す。このモデルではこれらの基準が満たされるため、それは、本データセットについて有効なモデルの指標である。

【0156】

10

図 10 は、バイオマーカー・12 週 PLSDA モデル：実測対予測を示す。

Y 空間サンプルの予測は、散布図としてプロットされ得る。RMSE (標準誤差) は、予測残差 (誤差) の標準偏差であり、 $(\sum (\text{実測値} - \text{予測値})^2 / N)$ の平方根として計算される。小 RMSE は、モデルの適合度の尺度である。プロットの Y 軸は、モデルの実測クラスを表し、X 軸は、予測クラスを表す。このプロットにおける Y 値および X 値のマッチは、モデルの適合度を立証する。

【0157】

PLSDA 分析により測定された組織移植後 12 週目の分子シグネチャーを形成するバイオマーカーの組合わせを表 6 に示す。

表 6 : バイオマーカー・12 週、PLSDA モデルの遺伝子

20

【表 15】

Affymetrix プローブセ ット ID	説明	一般名	Genbank	変化率	安定移植 片: 未処 理発現値
201792_at	AE結合タンパク質 1	AEBP1	NM_001129	8.84	212
242974_at	CD47 抗原(Rh-関連 抗原, インテグリン- 関連シグナル変換因 子)	CD47	AA446657	4.04	50
227140_at	CDNA FLJ11041 fis, クローン PLACE100 4405		AI343467	3.20	105
232090_at	CDNA FLJ11481 fis, クローン HEMBA100 1803		AI761578	3.00	102
229218_at	コラーゲン, タイプI , アルファ2	COL1A2	AA628535	2.67	212
232458_at	コラーゲン, タイプI II, アルファ1 (エー レルス-ダンロー症 候群タイプIV, 常染 色体 優性)	COL3A1	AU146808	0.47	66
227336_at	deltex相同体1ショ ウジョウバエ (Droso phila)	DTX1	AW576405	2.84	125
210165_at	デオキシリボヌクレ アーゼ I	DNASE1	M55983	2.42	189
227353_at	ゆう贅状表皮発育異 常症2	EVER2	BE671663	2.46	70
1560782_at	ホモサピエンスcDNA クローン IMAGE:51 86324, 部分的cds.	C22orf1; 239 AB: FAM1A	BC035326	0.42	112
242372_s_at	仮定的 タンパク質 DKFZp761N1114	DKFZp761N111 4	AL542291	2.79	329

10

20

30

40

【表 1 6】

222872_x_at	仮定的 タンパク質 FLJ22833	FLJ22833	AU157541	2.18	400
212768_s_at	イソ型 1マッチ: タンパク質: Sw:Q0708 1 Tr:095362 Tr:Q9Z 2Y4 Tr:095897 Tr:0 70624 Sw:Q99972 Sw :Q99784 Sw:Q62609 Tr:Q9TV76 Tr:Q9I9K 5 Sw:P01813 Tr:Q9I AK4 Tr:035429;染色体13でのクローンRP 11-209J19からのヒ トDNA配列は、EST, ST SおよびGSSを含む。 2つのイソ型(GW112 およびKIAA4294)を もつGW112タンパク 質についての遺伝子 を含む, 完全配列.	bA209J19.1	AL390736	2.43	143
229554_at	ルミカン	LUM	AI141861	2.43	82
227438_at	リンパ球アルファ キナーゼ	LAK	AI760166	2.52	55

10

20

30

【表 17】

226210_s_at	母系発現3	MEG3	AI291123	2.34	127
205267_at	POU ドメイン, クラス2, 会合因子 1	POU2AF1	NM_006235	2.23	39
218870_at	Rho GTPアーゼ活性化タンパク質 15	ARHGAP15	NM_018460	0.45	56
237639_at	SRSR846	UNQ846	AI913600	0.42	372
209374_s_at	シノニム: MU;ホモサピエンス免疫グロブリン重定常mu, mRNA (cDNA クローン MGC:1228 IMAGE:354448), 完全cds.	IGHM; MU	BC001872	2.22	84
236203_at	te62a03.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:2091244 3', gb:J02931 組織因子前駆体(ヒト)と類似;, mRNA配列.		AI377755	0.50	51
203083_at	トロンボスポンジン 2	THBS2	NM_003247	1.89	403

10

20

【0158】

30

一実施態様において、12週目に同定された好ましい遺伝子には、ルミカン (Onda et al., Exp.Mol.Pathol. (2002) 4月; 72(2): 142-9)、Smad3 (Saika et al., Am.J.Pathol. (2004) 2月; 164(2): 651-63)、AE結合タンパク質1 (Layne et al., J.Biol.Chem. (1998) 6/19; 273(25): 15654-60)、およびfrizzled-9 (Karasawa et al. (2002) J.Biol.Chem 10/4; 277(40): 37479-86. Epub 2002年7月22日)があるが、これらに限定されるわけではない。

【0159】

40

3.3 バイオマーカー「グローバル分析」: 腎臓移植の前および24週後でのゲノム予測バイオマーカーの同定

3.3.1 戦略

24週目で腎臓移植片機能が低下しており、組織病理学的にCANの診断が下された8患者からの腎臓TX後12週目に採取した連続腎臓プロトコル生検サンプルの遺伝子発現プロフィールを、TX後少なくとも12カ月まで同種移植片機能が安定している患者からの33腎臓生検サンプル、およびCANグレードIの組織学的徴候がある18生検サンプルの場合と比較した。サンプルのクラスを以下の通り定義した:

N (正常; 長期間安定した腎臓同種移植片): n = 33

06週 (TX後12週および24週の間) に明白なCANを発現している合併症のない患者からの生検材料): n = 8

12週 (TX後12週および24週の間) に明白なCANを発現している合併症のない

50

患者からの生検材料) : $n = 8$

CAN : 慢性同種移植腎症の組織病理学的徴候 : $n = 18$

【0160】

3.3.2 データ処理

MAS5変換データを各マイクロアレイの50パーセント点に正規化し、次いでハイブリダイゼーションのバッチにしたがって(GeneSpringバージョン7.2)、移植片機能が安定している患者からの全正常サンプル($n = 33$)のメディアンでの時点およびバッチにより正規化した。未処理発現強度がサンプル($n = 18$)の少なくとも25%で少なくとも100であるプローブセットのみを、以下の分析に含ませた(20549プローブセット)。

【0161】

これらのプローブセットをフィッシャーの正確検定にかけることにより、遺伝子発現変化およびクラス帰属関係間の関連を見出した。関連試験オプションを用いたFind Significant Parametersにより、パラメーターおよび寄与度全体にわたって各遺伝子についての関連試験が実施される。数値および非数値パラメーターおよび寄与度の両方が試験され得る。

【0162】

この分析では、群を1.1項記載の要領で定義した。試験の結果、1.1項記載のクラス帰属関係と0.0001未満の相関関係を示す578プローブセットのリストが得られた。正規化データを予測モデリングおよびバリデーション技術(2.3.2、2.3.3項)にかけることにより、このデータセットについて最善のモデルを同定した。

【0163】

3.3.3 バイオマーカー「グローバル分析」; OSCモデル、結果

図11は、バイオマーカーグローバル分析OSCモデル: 散布図を示す。散布図または散布グラフは、それぞれ水平軸および垂直軸に座標をもつ有限的な多くの点のみを示すことにより2セットの関連した量的または数的データを視覚的に表示および比較するために統計で使用するグラフである。図11において、各ドットは患者のサンプルを表す。データポイント間の相対的距離は、関連性/類似性の尺度である。「06週・前CAN」、「12週・前CAN」および「CAN」サンプルからの「N」サンプルの分離は、これらのプローブセットの使用によりデータポイント間を判別するアルゴリズム/モデルの有効性を示す。

【0164】

図12は、バイオマーカーグローバル分析OSCモデル: 「応答並べ替えによるバリデーション」を示す。応答並べ替えによるバリデーションは、サンプルのトレーニングセットおよび試験セットを作成する内部クロスバリデーションである。モデルを適合させることにより、トレーニングセットに基づいて試験セットを説明し、 $R^2 Y$ (被説明分散) および Q^2 (予測分散) についての値を計算し、プロットする。トレーニングおよび試験セットの無作為並べ替えにより、若干の $R^2 Y / Q^2$ が得られる。次いで、「実際の」ものを含む全モデルの $R^2 Y / Q^2$ 値をY軸で表し、X軸を並べ替えた応答変数およびもとの応答変数間の相関係数に割り当てることにより、バリデーションプロットを作成する。次いで、回帰直線を $R^2 Y$ ポイント間に当てはめ、 Q^2 ポイントを通してもう1本を当てはめる。回帰直線の切片は、データを当てはめるため得られた「バックグラウンド」 $R^2 Y$ および Q^2 の尺度として解釈され得る。切片が $R^2 Y$ については0.4前後およびそれ未満および Q^2 については0.05前後およびそれ未満であれば有効なモデルを示す。このモデルではこれらの基準が満たされるため、それは、本データセットについて有効なモデルの指標である。

【0165】

図13は、バイオマーカーグローバル分析OSCモデル: 実測対予測を示す。Y空間サンプルの予測は、散布図としてプロットされ得る。RMSE (標準誤差) は、予測残差 (誤差) の標準偏差であり、 $(\text{実測値} - \text{予測値})^2 / N$ の平方根として計算される。

10

20

30

40

50

小 R M S E は、モデルの適合度の尺度である。プロットの Y 軸は、モデルの実測クラスを表し、X 軸は、予測クラスを表す。このプロットにおける Y 値および X 値のマッチは、モデルの適合度を立証する。

【 0 1 6 6 】

O S C モデルを用いたグローバルデータ分析により測定された組織移植後に分子シグネチャーを形成するバイオマーカーの組合わせを表 7 に示す。

表 7 : バイオマーカーグローバル分析、O S C モデルの遺伝子

【表 1 8】

Affymetrix プローブセ ット ID	説明	一般名	Genbank	変化 率06 週- 前 CAN	変化 率12 週- 前 CAN	変化 率 CAN	安定 移植 片:未 処理 発現 値
244567_at	602343781F1 NIH_MGC_89 ホモサ ピエンス cDNA ク ローン IMAGE:4453556 5', mRNA 配列.		BG165613	1.51	1.21	1.71	103
244145_at	602371458F1 NIH_MGC_93 ホモサ ピエンス cDNA ク ローン IMAGE:4479327 5', mRNA 配列.		BG260337	1.49	1.58	1.52	102
201660_at	acyl-CoA シンテタ ーゼ長鎖ファミリ ー構成員3	ACSL3	AL525798	1.94	2.28	1.91	876
232175_at	ADP-リボシル化因 子1	ARF1	AI972094	1.43	1.58	1.78	108
232865_at	ALL1 融合遺伝子 ,5q31から	AF5Q31	N59653	1.55	1.51	1.97	179
236778_at	アルファサラセミ ア/精神遅滞症候群 X-結合(RAD54 相同 体, サッカロマイシ ス・セレヴィシエ (S. cerevisiae))	ATRX	AA826176	1.08	1.17	1.87	77

10

20

30

40

【表 19】

1563792_at	アムニオンレス 相同体 (マウス)	AMN	AK092824	1.37	1.57	1.81	98
226718_at	アンホテリン-誘 導遺伝子	KIAA1163	AA001423	1.12	1.24	1.37	142
227260_at	アンキリン反復 ドメイン 10	ANKRD10	AV724266	1.32	1.59	1.54	708
230972_at	アンキリン反復 ドメイン 9	ANKRD9	AW194999	1.16	1.33	1.66	656
206993_at	ATPシンターゼ, H ⁺ 輸送性, ミトコ ンドリア F0 複 合体, サブユニッ ト s (因子 B)	ATP5S	NM_015684	1.27	1.53	1.52	119
204719_at	ATP-結合カセッ ト, サブファミリ ーA(ABC1), 構成 員 8	ABCA8	NM_007168	0.81	0.65	0.65	350
233271_at	AU145563 HEMBA1 ホモサピエンス cDNA クローン HEMBA1005133 3', mRNA 配列.		AU145563	1.18	1.95	1.50	143
215204_at	AU147295 MAMMA1 ホモサピエンス cDNA クローン MAMMA1000264 3', mRNA 配列.		AU147295	1.99	2.06	3.37	90
236892_s_at	ムチンについて のB1	HAB1	BF590528	1.34	1.25	1.45	312
227896_at	BRCA2 および CDKN1A 相互作用 性タンパク質	BCCIP	AI373643	1.31	1.27	1.56	223

10

20

30

40

【表 2 0】

223679_at	カテニン(カドヘリン関連タンパク質), ベータ1, 88kDa	CTNNB1	AF130085	1.64	1.73	1.58	146
233019_at	CCR4-NOT 転写複合体, サブユニット 7	CNOT7	AU145061	1.17	1.32	1.59	89
233399_x_at	CDNA クロウン IMAGE:30352956, 部分的cds		AU145662	1.60	1.66	1.95	183
232351_at	CDNA FLJ10150 fis, クロウン HEMBA1003395		AK022308	1.54	1.76	1.70	152
234074_at	CDNA FLJ10946 fis, クロウン PLACE1000005		AU155494	1.29	1.15	1.76	99
232544_at	CDNA FLJ11572 fis, クロウン HEMBA1003373		AU144916	0.89	0.77	0.69	231
232991_at	CDNA FLJ11613 fis, クロウン HEMBA1004012		AK021675	0.91	0.81	0.79	107
232952_at	CDNA FLJ11942 fis, クロウン HEMBA1000652		AU146493	0.83	0.75	0.74	83
230791_at	CDNA FLJ12033 fis, クロウン HEMBA1001899		AU146924	1.37	1.58	1.43	241
233296_x_at	CDNA FLJ12131 fis, クロウン MAMMA1000254		AU147291	0.89	0.81	0.71	425
233498_at	CDNA FLJ14142 fis, クロウン MAMMA1002880		AK024204	0.58	0.61	0.68	282

10

20

30

40

【表 2 1】

230986_at	CDNA FLJ30065 fis, クローン ADRGL2000328		AI821447	0.95	0.83	0.73	96
241941_at	CDNA FLJ31511 fis, クローン NT2RI1000035		AA778747	0.94	0.84	0.67	75
1557270_at	CDNA FLJ36375 fis, クローン THYMU2008226		AA632049	1.21	1.55	1.72	283
235028_at	CDNA FLJ46440 fis, クローン THYMU3016022		BG288330	0.81	0.72	0.49	659
234604_at	CDNA: FLJ21228 fis, クローン COL00739		AK024881	0.68	0.69	0.64	62
233824_at	CDNA: FLJ21428 fis, クローン COL04203		AK025081	0.91	0.80	0.76	114
228143_at	セルロプラスミン (フェロキシダーゼ)	CP	AI684991	1.44	5.78	3.93	69
223191_at	染色体14 読み枠 112	C14orf112	AF151037	0.68	0.73	0.58	541
218453_s_at	染色体 6 読み枠 35	C6orf35	NM_018452	1.56	2.02	1.59	110
229012_at	染色体 9 読み枠 24	C9orf24	AW269443	0.77	0.58	0.41	142
1552455_at	染色体 9 読み枠 65	C9orf65	NM_138818	1.23	1.31	1.48	81
225377_at	染色体 9 読み枠 86	C9orf86	BE783949	0.81	0.80	0.76	173
239683_at	クエン酸リアー ゼ ベータ 様	CLYBL	AI476268	0.98	1.01	0.67	243

10

20

30

40

【表 2 2】

215504_x_at	クローン 25061 mRNA 配列		AF131777	1.04	1.17	1.45	482
243329_at	クローン IMAGE:121662 mRNA 配列		AI074450	1.33	1.65	1.62	195
231808_at	クローン IMAGE:5302006, mRNA		AY007106	1.04	1.54	1.44	213
225288_at	コラーゲン, タイ プ XXVII, アル ファ 1	COL27A1	AI949136	1.13	1.37	1.47	304
211025_x_at	シトクロム c オ キシダーゼ サブ ユニット Vb	COX5B	BC006229	1.28	1.14	1.49	1299
1556820_a_at	リンパ性白血病 で欠失, 2	DLEU2	H48516	1.36	1.37	1.78	67
1556821_x_at	リンパ性白血病 で欠失, 2	DLEU2	H48516	1.31	1.33	1.55	100
210165_at	デオキシリボヌ クレアーゼ I	DNASE1	M55983	1.22	1.16	1.55	149
218650_at	ディ・ジョージ症 候群決定領域遺 伝子 8	DGCR8	NM_022775	1.41	1.56	1.64	167
223763_at	ジストロブレピ ン結合 タンパク 質 1	DTNBP1	AL136637	1.10	1.16	1.44	82
227353_at	ゆう贅状表皮発 育異常症2	EVER2	BE671663	1.41	1.59	2.19	85
236520_at	EST384471 MAGE re配列s, MAGL ホ モサピエンス cDNA, mRNA 配列.		AW972380	1.25	1.24	1.66	128
214805_at	真核生物翻訳開 始因子 4A, イソ 型1	EIF4A1	U79273	1.24	1.25	1.61	153

10

20

30

40

【表 2 3】

242029_at	FAD104	FAD104	N32832	0.87	0.75	0.76	96
243649_at	F-box only タンパク質 7	FBX07	AI678692	0.91	0.75	0.74	71
230389_at	ホルミン結合タンパク質 1	FNBP1	BE046511	0.90	0.85	0.72	188
227163_at	グルタチオン S-トランスフェラーゼオメガ2	GST02	AL162742	0.71	0.72	0.67	361
215203_at	ゴルジ自己抗原, ゴルジサブファミリー-a, 4	GOLGA4	AW438464	1.25	1.44	1.36	109
229255_x_at	ゴルジ SNAP 受容体複合体構成員2	GOSR2	BF593917	0.81	0.77	0.75	142
227085_at	H2A ヒストンファミリー, 構成員 V	H2AV	AI823792	0.77	0.69	0.64	234
240405_at	H326	H326	AA707411	0.87	1.16	1.40	61
203394_s_at	hairy and enhancer of split 1, ショウジョウバエ (Drosophila)	HES1	BE973687	0.78	0.80	0.70	703
209960_at	肝細胞増殖因子(ヘパトポイエチンA; 散乱因子)	HGF	X16323	1.31	1.54	1.55	118
213359_at	異種核リボヌクレオタンパク質 D (高AUエレメントRNA 結合タンパク質1, 37kDa)	HNRPD	W74620	1.47	1.66	1.96	207
215553_x_at	ホモサピエンス cDNA FLJ14253 fis, クローン OVARC1001376.		AK024315	1.03	1.34	1.69	262

10

20

30

40

【表 2 4】

233813_a t	ホモサピエンス c DNA: FLJ23247 fi s, クローン COL0 3425.		AK02690 0	1.13	1.20	1.57	76
227298_a t	仮定的遺伝子, AK0 95117 (LOC401264)により裏付け, m RNA		AI80633 0	1.63	2.06	1.45	167
237108_x _at	仮定的 タンパク 質 DKFZp761G0122	DKFZp761G0 122	AW61184 5	0.83	0.82	0.70	276
219074_a t	仮定的 タンパク 質 FLJ10846	FLJ10846	NM_0182 41	1.41	1.52	1.64	418
1557828_ a_at	仮定的 タンパク 質 FLJ21657	FLJ21657	BE67506 1	0.81	0.69	0.72	148
222872_x _at	仮定的 タンパク 質 FLJ22833	FLJ22833	AU15754 1	1.17	1.48	1.40	456
233085_s _at	仮定的 タンパク 質 FLJ22833	FLJ22833	AV73484 3	1.21	1.37	1.44	415
229145_a t	仮定的 タンパク 質 LOC119504	LOC119504	AA54176 2	1.19	1.25	1.39	659
227550_a t	仮定的 タンパク 質 LOC143381	LOC143381	AW24272 0	1.01	1.07	1.36	222
227415_a t	仮定的 タンパク 質 LOC283508	LOC283508	BF10930 3	1.59	1.37	1.99	350
232288_a t	仮定的 タンパク 質 LOC283970	LOC283970	AK02620 9	4.60	6.51	13.5 4	77
226901_a t	仮定的 タンパク 質 LOC284018	LOC284018	AI21499 6	0.81	0.86	0.65	342
235482_a t	仮定的 タンパク 質 LOC285002	LOC285002	BE88686 8	0.82	0.82	0.73	132
227466_a t	仮定的 タンパク 質 LOC285550	LOC285550	BF10869 5	0.86	0.77	0.74	589

10

20

30

【表 2 5】

228040_at	仮定的 タンパク質 LOC286286	LOC286286	AW294192	1.19	1.40	1.49	468
1569189_at	仮定的 タンパク質 MGC29649	MGC29649	AF289605	0.77	0.76	0.67	75
225065_x_at	仮定的 タンパク質 MGC40157	MGC40157	AI826279	0.80	0.76	0.75	237
229444_at	仮定的 タンパク質 MGC4614	MGC4614	AI051046	0.82	0.73	0.77	198
218750_at	仮定的 タンパク質 MGC5306	MGC5306	NM_024116	1.26	1.99	1.55	239
223797_at	仮定的 タンパク質 PRO2852	PRO2852	AF130079	0.81	0.74	0.74	169
235756_at	IL2-UM0076-240300-056-G02 UM0076 ホモサピエンス cDNA, mRNA配列.		AW802645	1.81	1.97	1.66	75
239842_x_at	IMAGE:20075 Soares 幼児脳 INIB ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:20075, mRNA 配列.		W18186	0.89	0.80	0.75	190
209374_s_at	免疫グロブリン重定常 mu	IGHM	BC001872	0.83	0.79	0.73	123
242903_at	インターフェロンガンマ受容体 1		AI458949	1.56	1.82	2.00	90
229310_at	kelch 反復および BTB (POZ) ドメイン含有 9	KBTBD9	BE465475	0.86	0.84	0.76	175
236368_at	KIAA0368		BF059292	1.40	3.18	1.82	142
216000_at	KIAA0484 タンパク質	KIAA0484	AA732995	1.20	1.26	1.45	74
231956_at	KIAA1618	KIAA1618	AA976354	1.62	2.80	1.80	111
238087_at	キネシンファミリー構成員2C	KIF2C	AI587389	0.82	0.83	0.74	92
1555929_s_at	laa10f11.x1 8 5 週胚前舌8 5 EAT ホモサピエンス cDNA 3', mRNA配列.		BM873997	1.23	1.78	1.84	230

10

20

30

40

【表 2 6】

1557360_at	高ロイシンPPR- モチーフ含有	LRPPRC	CA430402	1.33	1.26	1.48	103
1569003_at	ラット液胞膜タンパク質1の確 からしいオーソ ログ	VMP1	AL541655	0.85	0.82	0.73	213
223223_at	酵母ARV1の確か らしいオーソロ グ	ARV1	AF321442	1.23	1.37	1.58	520
227438_at	リンパ球アルフ ァ-キナーゼ	LAK	AI760166	0.84	0.76	0.65	63
226841_at	マクロファージ 発現遺伝子 1	MPEG1	BF590697	1.06	1.62	1.76	87
214048_at	メチル-CpG 結 合 ドメイン タ ンパク質 4	MBD4	AI913365	1.03	0.96	0.65	89
239001_at	ミクロソームグ ルタチオンS-ト ランスフェラー ゼ1	MGST1	AV705233	1.19	1.33	1.40	62
217980_s_at	ミトコンドリア リボソームタン パク質 L16	MRPL16	NM_017840	0.82	0.84	0.65	609
231274_s_at	ミトコンドリア 溶質担体タンパ ク質	MSCP	R92925	0.79	0.81	0.69	193
1558732_at	マイトジェン- 活性化プロテイ ンキナーゼキナ ーゼキナーゼキ ナーゼ4	MAP4K4	AK074900	0.82	0.87	0.70	128
223218_s_at	リポ多糖類によ り誘導されるア ンキリン反復を 有する分子	MAIL	AB037925	0.84	0.75	0.71	708

10

20

30

40

【表 2 7】

1563469_at	MRNA; cDNA DKFZp313M0417 (クローン DKFZp313M0417から)		AL832681	1.35	1.30	1.38	74
234224_at	MRNA; cDNA DKFZp43400919 (クローン DKFZp43400919から)		AL137541	0.93	0.79	0.80	79
227576_at	MRNA; cDNA DKFZp686K1098 (クローン DKFZp686K1098から)		AW003140	0.99	0.77	0.69	452
228217_s_at	MRNA; cDNA DKFZp686P09209 (クローン DKFZp686P09209から)		BF973374	1.02	1.41	1.77	365
210210_at	ミエリンタンパク質ゼロ様 1	MPZL1	AF181660	1.24	1.41	1.78	105
233539_at	N-アシル-ホスファチジルエタノールアミン-加水分解性ホスホリパーゼ D	NAPE-PLD	AK000801	1.15	1.37	1.69	135
202000_at	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノン)1アルファサブコンプレックス, 6, 14kDa	NDUFA6	BC002772	1.20	1.48	1.45	693
218320_s_at	ニューロンタンパク質 17.3	P17.3	NM_019056	0.87	0.67	0.68	993
233626_at	ニューロピリン	NRP1	AK024580	1.38	1.39	1.43	53

10

20

30

40

【表 2 8】

235985_at	nj45a06. x5 NCL_CGAP_Pr9 ホ モサピエンス cDNA クローン IMAGE:995410類 似-A1u反復エレ メントを含む;エ レメントTAR1 反 復エレメントを 含む ;, mRNA 配 列.		AI821477	0.96	0.80	0.73	115
226991_at	活性化T細胞の核 因子, 細胞質, カ ルシニューリン- 依存的 2		AA489681	1.38	1.73	1.87	88
206302_s_at	nudix (ヌクレオ シドニリン酸結 合部分X)-型モチ ーフ4	NUDT4	NM_019094	1.29	1.35	1.52	955
238408_at	酸化抵抗性 1	OXR1	AW086258	1.27	1.28	1.46	84
205336_at	バルブアルブミ ン	PVALB	NM_002854	0.87	0.71	0.74	319
204300_at	PET112-様(酵母)	PET112L	NM_004564	1.21	1.39	1.55	205
209504_s_at	プレクストリン 相同体ドメイン 含有, ファミリー B(エベクチン)構 成員 1	PLEKHB1	AF081583	1.34	1.59	1.55	144
242922_at	pM5 タンパク質	PM5	AU151198	1.21	1.23	1.49	60
236407_at	カリウム電圧-ゲ ートチャンネル, Isk-関連ファミ リー, 構成員1	KCNE1	R73518	1.28	1.47	1.52	127
1568706_s_at	Pp12719 mRNA, 完 全cds		AF318328	1.38	1.42	2.03	96

10

20

30

40

【表 2 9】

1558017_s_at	PRKC, アポトーシス, WT1, 調節因子	PAWR	BG109597	1.24	1.37	1.47	179
200979_at	ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(リポアミド) アルファ 1	PDHA1	BF739979	1.29	1.49	1.69	650
223802_s_at	網膜芽細胞腫結合タンパク質 6	RBBP6	AF063596	1.43	1.69	1.97	249
225171_at	Rho GTPアーゼ活性化タンパク質 18	ARHGAP18	BE644830	1.16	1.28	1.47	1407
221989_at	リボソームタンパク質 L10	RPL10	AW057781	1.11	1.35	1.69	212
1555878_at	リボソームタンパク質 S24	RPS24	AK094613	1.63	1.79	1.66	138
212030_at	RNA-結合領域 (RNP1, RRM)含有 7	RNPC7	BG251218	1.11	1.42	1.74	293
241996_at	RUNおよびFYVEドメイン含有 2	RUFY2	AI669591	1.52	1.92	1.44	194
215028_at	sema ドメイン, 貫膜ドメイン (TM), および細胞質ドメイン, (セマホリン) 6A	SEMA6A	AB002438	1.05	1.43	1.30	63
1559263_s_at	仮定的タンパク質 D730019B10 (LOC340152)と類似, mRNA		BG397809	1.34	1.37	1.54	96

10

20

30

40

【表 3 0】

222145_at	PI-3-キナーゼ関連キナーゼSMG-1イソ型1と類似; ラムダ/イオータプロテインキナーゼC-相互作用性 タンパク質; ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ関連プロテインキナーゼ (LOC390682), mRNA		AK027225	1.16	1.15	1.34	64	10
202781_s_at	骨格筋および腎臓濃厚イノシトールホスファターゼ	SKIP	AI806031	0.79	0.79	0.64	101	20
217591_at	SKI-様	SKIL	BF725121	1.21	1.07	1.63	114	
1559351_at	溶質担体ファミリー16 (モノカルボン酸輸送体), 構成員 9	SLC16A9	BI668873	1.67	1.36	1.80	138	
244353_s_at	溶質担体ファミリー2 (促通グルコース輸送体), 構成員12	SLC2A12	AI675682	1.09	1.21	1.74	125	30
231437_at	溶質担体ファミリー35, 構成員D2	SLC35D2	AA693722	1.81	1.71	1.87	120	
233123_at	溶質担体ファミリー40 (鉄-調節輸送体), 構成員1	SLC40A1	AU156956	1.43	1.85	2.09	120	40

【表 3 1】

232392_at	スプライシング因子, 高アルギニン/セリン3	SFRS3	BE927772	1.39	1.64	1.60	565
204690_at	シタキシシン 8	STX8	NM_004853	1.00	1.19	1.48	622
221617_at	TAF9-様RNAポリメラーゼII, TATA box 結合タンパク質 (TBP)-関連因子, 31kDa		AF077053	1.22	1.37	1.75	80
221938_x_at	甲状腺ホルモン受容体関連タンパク質 5	THRAP5	AW262690	1.18	1.11	1.73	168
228793_at	甲状腺ホルモン受容体 相互作用因子8	TRIP8	BF002296	1.43	1.60	1.92	395
210886_x_at	TP53活性化タンパク質1	TP53AP1	AB007457	1.33	1.37	2.04	182
228971_at	転写配列、タンパク質 ref:NP_055301.1 (ホモサピエンス) ニューロンスレッドタンパク質 [ホモサピエンス]と 中程度の類似性を示す		AI357655	1.07	1.19	1.46	704
233518_at	転写配列、タンパク質 ref:NP_071431.1 (ホモサピエンス) サイトカイン受容体-様因子2と中程度の類似性を示す ; サイトカイン受容体CRL2前駆体 [ホモサピエンス]		AU144449	0.97	1.20	1.57	74

10

20

30

40

【表 3 2】

241798_at	転写配列、タンパク質sp:P39195 (ホモサピエンス)と中程度の類似性を示す、ALU8_HUMAN Aluサブファミリー-SX 配列 contamination warning entry		AI339930	0.77	0.64	0.73	69
243256_at	転写配列、タンパク質 ref:NP_060265.1 (ホモサピエンス)と弱い類似性を示す、仮定的タンパク質FLJ20378 [ホモサピエンス]		AW796364	1.31	1.47	1.54	157
239735_at	転写配列、タンパク質 ref:NP_060312.1 (ホモサピエンス)と弱い類似性を示す、仮定的タンパク質FLJ20489 [ホモサピエンス]		N67106	1.33	1.27	1.56	150
242191_at	転写配列、タンパク質 ref:NP_060312.1 (ホモサピエンス)と弱い類似性を示す、仮定的タンパク質FLJ20489[ホモサピエンス]		AI701905	0.68	0.50	0.49	174

10

20

30

40

【表 3 3】

242490_at	転写配列、タンパク質 ref:NP_062553.1 (ホモサピエンス) と弱い類似性を示す、仮定的タンパク質FLJ11267 [ホモサピエンス]		AA564255	1.16	1.23	1.55	165
241897_at	転写配列、タンパク質 ref:NP_071431.1 (ホモサピエンス) サイトカイン受容体様因子2と弱い類似性を示す; サイトカイン受容体CRL2前駆体 [ホモサピエンス]		AA491949	1.32	1.49	1.93	492
230590_at	転写配列		BE675486	0.88	0.81	0.67	107
230733_at	転写配列		H98113	0.67	0.63	0.61	127
230773_at	転写配列		AA628511	1.09	1.26	1.60	131
237317_at	転写配列		AW136338	1.02	0.75	0.70	79
239238_at	転写配列		AI208857	1.35	2.25	2.19	113
240128_at	転写配列		H94876	1.18	1.34	1.62	54
241837_at	転写配列		AI289774	1.64	1.71	1.73	59
241936_x_at	転写配列		AI654130	1.07	1.17	1.51	175
241940_at	転写配列		BF477544	1.22	1.25	1.66	63
242299_at	転写配列		AW274468	0.80	0.77	0.70	82

10

20

30

【表 3 4】

242536_at	転写配列		AI522220	1.25	1.28	1.97	533
242579_at	転写配列		AA935461	1.35	1.16	1.73	270
242673_at	転写配列		AA931284	1.36	1.55	1.62	99
243591_at	転写配列		AI887749	1.30	1.72	2.12	106
243675_at	転写配列		BF512500	1.12	1.42	1.89	81
243933_at	転写配列		AI096634	1.15	1.24	1.48	142
244414_at	転写配列		AI148006	1.31	1.62	1.54	439
244674_at	転写配列		AA936428	1.19	1.11	1.54	131
244797_at	転写配列		AI269245	1.37	1.23	1.57	168
224566_at	栄養膜由来非コーディング RNA	TncRNA	AI042152	1.27	1.42	1.95	1769
202510_s_at	腫瘍壊死因子, アルファ-誘導タンパク質 2	TNFAIP2	NM_006291	1.46	1.63	1.71	211
232141_at	U2 (RNU2) 小核 RNA auxiliary 因子 1	U2AF1	AU144161	1.03	1.24	1.32	109
228142_at	ユビキノーラー-シトクロム c レダクターゼ複合体 (7.2 kD)	HSPC051	BE208777	1.34	1.39	1.42	177
1557409_at	UI-CF-FN0-aex-p-22-0-UI. s1 UI-CF-FN0 ホモサピエンス cDNA クローン UI-CF-FN0-aex-p-22-0-UI 3', mRNA配列.		CA313226	1.19	1.56	1.64	124
1558801_at	無名タンパク質産物; ホモサ ピエンス cDNA FLJ31207 fis, クローン KIDNE2003357.		AK055769	1.14	1.40	1.55	169

10

20

30

【表 3 5】

225198_at	VAMP (小胞関連膜タンパク質)-関連タンパク質 A, 33kDa	VAPA	AL571942	1.78	1.90	2.34	658
222303_at	v-ets 赤芽球症ウイルスE26発癌遺伝子相同体 2 (鳥類)	ETS2	AV700891	1.32	1.86	2.52	177
235850_at	WD 反復 ドメイン 5B	WDR5B	BF434228	1.13	1.21	1.56	289
229647_at	wh65e08. x1 NCI_CGAP_Kid11 ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:2385638 3' 類似-A1u 反復エレメントを含む; エレメントMER22 反復エレメントを含む; mRNA 配列		AI762401	2.01	2.01	2.22	793
242406_at	w147a04. x1 NCI_CGAP_Ut1 ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:2428014 3', mRNA 配列.		AI870547	0.73	0.58	0.70	126
224590_at	X(不活性)-特異的転写物	XIST	BE644917	1.26	1.44	1.54	261

10

20

30

【表 3 6】

238913_at	xm54d01. x1 NCI_CGAP_GC6 ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:2688001 3' 類似-Alu 反復エレメントを含む; エレメントMER28 MER28反復エレメントを含む;, mRNA 配列.		AW235215	1.25	1.60	1.64	111
222281_s_at	xs86h03. x1 NCI_CGAP_Ut2 ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:2776565 3' 類似-Alu反復エレメントを含む ;MER38反復エレメントを含む;, mRNA 配列.		AW517716	1.47	1.56	1.78	350
234033_at	yd35c06. s1 Soares 胎児肝臓 脾臓1NFLS ホモサピエンス cDNA ク ローン IMAGE:110218 3', mRNA 配列.		T71269	1.15	1.19	1.61	130
239654_at	ye62h04. s1 Soares胎児肝臓脾 臓1NFLS ホモサピ エンス cDNA クロ ーン IMAGE:122359 3', mRNA 配列.		T98846	1.07	1.32	1.62	139

10

20

30

40

【表 3 7】

242241_x_at	yi33f06.s1 Soares胎盤Nb2HP ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:141059 3' 類似-A1u 反復エ レメントを含む ;L1反復エレメン トを含む; mRNA 配列.		R66713	1.24	1.36	1.63	73
1565566_a_at	yn76g07.s1 Soares成人脳 N2b5HB55Y ホモサ ピエンス cDNA ク ローン IMAGE:174396 3' 類似-A1u反復エ レメントを含む; mRNA 配列.		H21394	0.96	1.26	1.35	84
217586_x_at	yy28g05.s1 Soaresメラノサイ ト2NbHM ホモサピ エンス cDNA クロ ーン IMAGE:272600 3' 類似-A1u反復エ レメントを含む; mRNA 配列.		N35922	1.44	1.53	1.58	370

10

20

30

【表 3 8】

226163_at	亜鉛 フィンガー および BTB ドメ イン含有9	ZBTB9	AW291499	1.27	1.15	1.56	159
1569312_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 146	ZNF146	BE383308	1.08	1.24	1.53	85
231848_x_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 207	ZNF207	AW192569	0.94	0.56	0.66	344
239937_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 207	ZNF207	AI860558	1.02	1.17	1.52	128
215012_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 451	ZNF451	AU144775	1.35	2.08	2.60	153
219741_x_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 552	ZNF552	NM_024762	1.20	1.31	1.66	184
230503_at	zo02d03.s1 Stratagene結腸 (#937204) ホモ サピエンス cDNA クローン IMAGE:566501 3', mRNA 配列.		AA151917	0.69	0.68	0.68	159

10

20

【 0 1 6 7 】

3.3.4 バイオマーカー「グローバル分析」；OPLSモデル、結果

30

図14は、バイオマーカーグローバル分析OPLSモデル：散布図を示す。散布図または散布グラフは、それぞれ水平軸および垂直軸に座標をもつ有限的な多くの点のみを示すことにより2セットの関連した量的または数的データを視覚的に表示および比較するために統計で使用されるグラフである。図2において、各ドットは患者のサンプルを表す。データポイント間の相対的距離は、関連性/類似性の尺度である。「06週・前CAN」、「12週・前CAN」、「CAN」サンプルからの「N」サンプルの分離は、これらのプロブセットの使用によりデータポイント間を判別するアルゴリズム/モデルの有効性を示す。

【 0 1 6 8 】

図15は、バイオマーカー・グローバル分析OPLSモデル：実測対予測を示す。応答並べ替えによるバリデーションは、サンプルのトレーニングセットおよび試験セットを作成する内部クロスバリデーションである。モデルを適合させることにより、トレーニングセットに基づいて試験セットを説明し、 $R^2 Y$ （被説明分散）および Q^2 （予測分散）についての値を計算し、プロットする。トレーニングおよび試験セットの無作為並べ替えにより、若干の $R^2 Y / Q^2$ が得られる。次いで、「実際の」ものを含む全モデルの $R^2 Y / Q^2$ 値をY軸で表し、X軸を並べ替えた応答変数およびもとの応答変数間の相関係数に割り当てることにより、バリデーションプロットを作成する。次いで、回帰直線を $R^2 Y$ ポイント間に当てはめ、 Q^2 ポイントを通してもう1本を当てはめる。回帰直線の切片は、データを当てはめるため得られた「バックグラウンド」 $R^2 Y$ および Q^2 の尺度として解釈され得る。切片が $R^2 Y$ については0.4前後およびそれ未満および Q^2 については0.

40

50

0.5前後およびそれ未満であれば有効なモデルを示す。このモデルではこれらの基準が満たされるため、それは、本データセットについて有効なモデルの指標である。

【0169】

図16は、バイオマーカーグローバル分析OPLSモデル：実測対予測を示す。Y空間サンプルの予測は、散布図としてプロットされ得る。RMSE（標準誤差）は、予測残差（誤差）の標準偏差であり、 $\sqrt{\frac{1}{N} \sum (実測値 - 予測値)^2}$ の平方根として計算される。小RMSEは、モデルの適合度の尺度である。プロットのY軸は、モデルの実測クラスを表し、X軸は、予測クラスを表す。このプロットにおけるY値およびX値のマッチは、モデルの適合度を立証する。

【0170】

OPLSモデルを用いたグローバルデータ分析により測定された組織移植後分子シグネチャーを形成するバイオマーカー遺伝子の組合わせを表11に示す。

表11：バイオマーカーグローバル分析、OPLSモデルの遺伝子

【表 3 9】

Affymetrix プローブセ ットID	説明	一般名	Genbank	変化 率06 週- 前 -CAN	変化 率12 週- 前 -CAN	変化 率 CAN	安定 移植 片:未 処理 発現 値
244567_at	602343781F1 NIH_MGC_89 ホモサ ピエンス cDNA ク ローン IMAGE:4453556 5', mRNA 配列.		BG165613	1.5	1.2	1.7	103
244145_at	602371458F1 NIH_MGC_93 ホモサ ピエンス cDNA ク ローン IMAGE:4479327 5', mRNA 配列.		BG260337	1.2	2.0	1.7	102
232175_at	ADP-リボシル化 因 子 1	ARF1	AI972094	1.5	1.6	1.5	108
238996_x_at	アルドラーゼA, フ ルクトース-ビスホ スフェート	ALDOA	AI921586	1.9	2.3	1.9	413
232865_at	5q31からのALL1融 合遺伝子	AF5Q31	N59653	1.4	1.6	1.8	179
236778_at	アルファ サラセミ ア/精神遅滞症候群 X-結合 (RAD54 相同 体, サッカロマイ シス・セレヴィシエ (<i>S. cerevisiae</i>))	ATRX	AA826176	1.6	1.5	2.0	77
1563792_at	アムニオンレス相 同体 (マウス)	AMN	AK092824	1.1	1.2	1.9	98

10

20

30

40

【表 4 0】

226718_at	アンホテリン誘導遺伝子	KIAA1163	AA001423	1.4	1.6	1.8	142
229903_x_at	アミラーゼ, アルファ 2B; すい臓	AMY2B	AI632212	1.1	1.2	1.4	350
219962_at	アンギオテンシンI変換酵素(ペプチジル-ジペプチダーゼ A) 2	ACE2	NM_021804	1.3	1.6	1.5	378
227260_at	アンキリン反復ドメイン 10	ANKRD10	AV724266	1.2	1.3	1.7	708
230972_at	アンキリン反復ドメイン 9	ANKRD9	AW194999	1.3	1.5	1.5	656
224489_at	ARF タンパク質	LOC51326	BC006271	0.8	0.6	0.6	86
206993_at	ATPシンターゼ, H ⁺ 輸送性, ミトコンドリアF0 複合体, サブユニット s (因子 B)	ATP5S	NM_015684	1.2	2.0	1.5	119
204719_at	ATP-結合カセット, サブファミリーA (ABC1), 構成員 8	ABCA8	NM_007168	2.0	2.1	3.4	350
233271_at	AU145563 HEMBA1 ホモサピエンス cDNA クローン HEMBA1005133 3', mRNA 配列.		AU145563	0.8	0.5	0.7	143
215204_at	AU147295 MAMMA1 ホモサピエンス cDNA クローン MAMMA1000264 3', mRNA 配列.		AU147295	1.3	1.2	1.5	90

10

20

30

40

【表 4 1】

236892_s_at	ムチンに関するB1	HAB1	BF590528	1.3	1.3	1.6	312
239791_at	ムチンに関するB1	HAB1	AI125255	1.0	1.0	0.7	94
227896_at	BRCA2および CDKN1A 相互作用 性 タンパク質	BCCIP	AI373643	1.6	1.7	1.6	223
223679_at	カテニン(カドヘ リン関連タンパク 質), ベータ 1, 88kDa	CTNNB1	AF130085	1.2	1.3	1.6	146
233019_at	CCR4-NOT転写複合 体, サブユニット 7	CNOT7	AU145061	1.6	1.7	2.0	89
204510_at	CDC7 細胞分裂周 期サッカロマイシ ス・セレヴィシエ (<i>S. cerevisiae</i>)	CDC7	NM_003503	1.5	1.8	1.7	104
233399_x_at	CDNA クローン IMAGE:30352956, 部分的 cds		AU145662	1.3	1.1	1.8	183
232351_at	CDNA FLJ10150 fis, クローン HEMBA1003395		AK022308	0.9	0.8	0.7	152
234074_at	CDNA FLJ10946 fis, クローン PLACE1000005		AU155494	1.4	1.3	1.4	99
227140_at	CDNA FLJ11041 fis, クローン PLACE1004405		AI343467	0.8	0.7	0.7	108
232544_at	CDNA FLJ11572 fis, クローン HEMBA1003373		AU144916	1.4	1.6	1.4	231

10

20

30

40

【表 4 2】

232991_at	CDNA FLJ11613 fis, クローン HEMBA1004012		AK021675	0.9	0.8	0.7	107
232952_at	CDNA FLJ11942 fis, クローン HEMBA1000652		AU146493	0.6	0.6	0.7	83
230791_at	CDNA FLJ12033 fis, クローン HEMBA1001899		AU146924	1.0	0.9	0.7	241
233498_at	CDNA FLJ14142 fis, クローン MAMMA1002880		AK024204	0.9	0.8	0.7	282
230986_at	CDNA FLJ30065 fis, クローン ADRGL2000328		AI821447	1.1	1.4	1.3	96
241941_at	CDNA FLJ31511 fis, クローン NT2RI1000035		AA778747	0.9	0.8	0.7	75
1557270_at	CDNA FLJ36375 fis, クローン THYMU2008226		AA632049	1.2	1.5	1.7	283
235028_at	CDNA FLJ46440 fis, クローン THYMU3016022		BG288330	1.5	2.1	1.5	659
234604_at	CDNA: FLJ21228 fis, クローン COL00739		AK024881	1.6	2.0	1.6	62
233824_at	CDNA: FLJ21428 fis, クローン COL04203		AK025081	0.8	0.7	0.5	114
216782_at	CDNA: FLJ23026 fis, クローン LNG01738		AK026679	0.7	0.7	0.6	488

10

20

30

40

【表 4 3】

214196_s_at	セロイド-リポフ スチノシス, ニュ ーロン2, 後期幼児 期(ヤンスキー-ビ ールショースキー 病)	CLN2	AA602532	1.6	1.3	1.9	84
228143_at	セルロプラスミン (フェロキシダー ゼ)	CP	AI684991	0.9	0.8	0.8	69
223191_at	染色体 14 読み枠 112	C14orf112	AF151037	0.7	0.7	0.7	541
218796_at	染色体 20 読み枠 42	C20orf42	NM_017671	1.4	5.8	3.9	107
218453_s_at	染色体 6 読み枠 35	C6orf35	NM_018452	0.7	0.7	0.6	110
229012_at	染色体 9 読み枠 24	C9orf24	AW269443	1.2	1.6	1.4	142
1552455_at	染色体 9 読み枠 65	C9orf65	NM_138818	1.6	2.0	1.6	81
225377_at	染色体 9 読み枠 86	C9orf86	BE783949	0.8	0.6	0.4	173
239683_at	クエン酸リアーゼ ベータ様	CLYBL	AI476268	1.2	1.3	1.5	243
215504_x_at	クローン 25061 mRNA 配列		AF131777	0.7	0.6	0.7	482
243329_at	クローン IMAGE:121662 mRNA 配列		AI074450	1.0	1.0	0.7	195
231808_at	クローン IMAGE:5302006, mRNA		AY007106	1.0	1.2	1.4	213

10

20

30

40

【表 4 4】

205229_s_at	凝固因子 C 相同体, コクリン アメリカカブトガニ (Limulus polyphemus)	COCH	AA669336	0.8	1.5	1.5	86
225288_at	コラーゲン, タイプ XXVII, アルファ 1	COL27A1	AI949136	1.3	1.7	1.6	304
205159_at	コロニー刺激因子 2 受容体, ベータ, 低-親和力 (顆粒球-マクロファージ)	CSF2RB	AV756141	1.0	1.5	1.4	106
211025_x_at	シトクロム c オキシダーゼサブユニット Vb	COX5B	BC006229	1.4	1.5	1.4	1299
225503_at	デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ (SDR ファミリー) X-結合	DHRX	AL547782	1.1	1.4	1.5	178
1556820_a_at	リンパ性白血病で欠失, 2	DLEU2	H48516	1.3	1.1	1.5	67
1556821_x_at	リンパ性白血病で欠失, 2	DLEU2	H48516	1.4	1.4	1.8	100
210165_at	デオキシリボヌクレアーゼ I	DNASE1	M55983	1.3	1.3	1.6	149
218650_at	ディ-ジョージ症候群決定領域遺伝子 8	DGCR8	NM_022775	1.2	1.2	1.6	167
223763_at	ジストロブレビン結合タンパク質 1	DTNBP1	AL136637	1.4	1.6	1.6	82
227353_at	ゆう贅状表皮発育異常症 2	EVER2	BE671663	1.1	1.2	1.4	85

10

20

30

40

【表 4 5】

236520_at	EST384471 MAGE re 配列s, MAGL ホモ サピエンス cDNA, mRNA 配列.		AW972380	1.4	1.6	2.2	128
214805_at	真核生物翻訳開始 因子 4A, イソ型 1	EIF4A1	U79273	1.5	1.4	1.7	153
230389_at	ホルミン結合 タ ンパク質 1	FNBP1	BE046511	1.2	1.2	1.7	188
244509_at	G タンパク質-結 合受容体 155	GPR155	AW449728	1.2	1.2	1.6	69
210358_x_at	GATA 結合タンパ ク質 2	GATA2	BC002557	0.9	0.7	0.8	111
227163_at	グルタチオン S- トランスフェラー ゼ オメガ 2	GSTO2	AL162742	0.9	0.7	0.7	361
215203_at	ゴルジ自己抗原, ゴルジンサブファ ミリー a, 4	GOLGA4	AW438464	0.9	0.8	0.7	109
229255_x_at	ゴルジ SNAP 受容 体複合体構成員 2	GOSR2	BF593917	0.7	0.7	0.7	142
240405_at	H326	H326	AA707411	1.3	1.4	1.4	61
203394_s_at	hairy and enhancer of split 1, ショウジョウ バエ(Drosophila)	HES1	BE973687	1.9	2.2	1.8	703
209960_at	肝細胞増殖因子 (ヘ パトポイエチン A; 散乱因子)	HGF	X16323	0.8	0.8	0.7	118
213359_at	異種核リボヌクレ オタンパク質 D (高 AU-エレメント RNA 結合 タンパ ク質 1, 37kDa)	HNRPD	W74620	0.8	0.7	0.6	207

10

20

30

40

【表 4 6】

1560782_at	ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:5186324, 部分的 cds.		BC035326	1.7	1.6	1.9	101
215553_x_at	ホモサピエンス cDNA FLJ14253 fis, クローン OVARC1001376.		AK024315	1.5	1.6	2.0	262
233813_at	ホモサピエンス cDNA: FLJ23247 fis, クローン COL03425.		AK026900	1.7	1.4	1.9	76
231886_at	ホモサピエンス mRNA; cDNA DKFZp434B2016 (クローン DKFZp434B2016から).		AL137655	0.8	0.8	0.7	73
228564_at	仮定的遺伝子、 BC013438により 裏付け		AI569804	1.3	1.5	1.5	439
241031_at	仮定的 LOC145741		BE218239	1.5	1.7	2.0	68
237108_x_at	仮定的 タンパク 質 DKFZp761G0122	DKFZp761G0122	AW611845	1.0	1.3	1.7	276
219074_at	仮定的 タンパク 質 FLJ10846	FLJ10846	NM_018241	1.1	1.2	1.6	418
222788_s_at	仮定的 タンパク 質 FLJ11220	FLJ11220	BE888593	0.9	0.8	0.6	106
226967_at	仮定的 タンパク 質 FLJ14768	FLJ14768	BG231981	1.6	2.1	1.4	156
1557828_a_at	仮定的 タンパク 質 FLJ21657	FLJ21657	BE675061	0.8	0.8	0.7	148

10

20

30

40

【表 4 7】

222872_x_at	仮定的 タンパク質 FLJ22833	FLJ22833	AU157541	1.4	1.5	1.6	456
233085_s_at	仮定的 タンパク質 FLJ22833	FLJ22833	AV734843	0.8	0.7	0.7	415
229145_at	仮定的 タンパク質 LOC119504	LOC119504	AA541762	1.2	1.5	1.4	659
227550_at	仮定的 タンパク質 LOC143381	LOC143381	AW242720	1.2	1.4	1.4	222
227415_at	仮定的 タンパク質 LOC283508	LOC283508	BF109303	1.2	1.3	1.4	350
232288_at	仮定的 タンパク質 LOC283970	LOC283970	AK026209	1.6	1.5	1.6	77
226901_at	仮定的 タンパク質 LOC284018	LOC284018	AI214996	1.9	2.1	1.5	342
235482_at	仮定的 タンパク質 LOC285002	LOC285002	BE886868	1.6	1.4	2.0	132
228040_at	仮定的 タンパク質 LOC286286	LOC286286	AW294192	4.6	6.5	13.5	468
1569189_at	仮定的 タンパク質 MGC29649	MGC29649	AF289605	0.8	0.9	0.6	75
225065_x_at	仮定的 タンパク質 MGC40157	MGC40157	AI826279	0.8	0.8	0.7	237
218750_at	仮定的 タンパク質 MGC5306	MGC5306	NM_024116	0.9	0.8	0.7	239
223797_at	仮定的 タンパク質 PRO2852	PRO2852	AF130079	1.2	1.4	1.5	169
235756_at	IL2-UM0076-240300-056-G02 UM0076 ホモサピエンス cDNA, mRNA 配列.		AW802645	0.8	0.8	0.7	75
239842_x_at	IMAGE:20075 Soares幼児脳 1N1B ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:20075, mRNA 配列.		W18186	0.9	0.9	0.6	190

10

20

30

40

【表 4 8】

209374_s_at	免疫グロブリン 重定常 mu	IGHM	BC001872	0.8	0.8	0.8	123
212827_at	免疫グロブリン 重定常 mu	IGHM	X17115	0.9	0.7	0.6	95
209031_at	免疫グロブリン スーパーファミ リー, 構成員 4	IGSF4	AL519710	1.3	1.8	1.6	921
201508_at	インスリン様増 殖因子 結合 タ ンパク質 4	IGFBP4	NM_001552	0.8	0.7	0.8	238
226535_at	インテグリン, ベ ータ 6	ITGB6	AK026736	1.3	2.0	1.6	1574
242903_at	インターフェロ ンガンマ受容体 1		AI458949	0.8	0.7	0.7	90
224361_s_at	インターロイキ ン17 受容体 B	IL17RB	AF250309	0.9	0.7	0.7	394
229310_at	kelch 反復およ びBTB (POZ) ド メイン含有9	KBTBD9	BE465475	1.8	2.0	1.7	175
236368_at	KIAA0368		BF059292	1.7	2.5	1.5	142
216000_at	KIAA0484 タンパ ク質	KIAA0484	AA732995	0.8	0.8	0.7	74
231956_at	KIAA1618	KIAA1618	AA976354	1.6	1.8	2.0	111
238087_at	キネシンファミ リー 構成員 2C	KIF2C	AI587389	1.4	3.2	1.8	92
1555929_s_at	laa10f11.x1 8 5 週胚 前舌 8 5 EAT ホモサピエ ンス cDNA 3', mRNA 配列.		BM873997	1.2	1.3	1.5	230
1557360_at	高ロイシン PPR- モチーフ含有	LRPPRC	CA430402	1.6	2.8	1.8	103

10

20

30

40

【表 4 9】

1569003_at	ラット液胞膜タンパク質1の確からしいオーソログ	VMP1	AL541655	1.2	1.8	1.8	213
223223_at	酵母ARV1の確からしいオーソログ	ARV1	AF321442	1.3	1.3	1.5	520
229554_at	ルミカン	LUM	AI141861	0.8	0.8	0.7	95
227438_at	リンパ球アルファ-キナーゼ	LAK	AI760166	1.2	1.4	1.6	63
226841_at	マクロファージ発現遺伝子 1	MPEG1	BF590697	0.8	0.8	0.7	87
214048_at	メチル-CpG 結合ドメインタンパク質 4	MBD4	AI913365	1.1	1.6	1.8	89
239001_at	ミクロソームグルタチオン S-トランスフェラーゼ 1	MGST1	AV705233	1.0	1.0	0.6	62
217980_s_at	ミトコンドリアリボソームタンパク質 L16	MRPL16	NM_017840	0.8	0.8	0.7	609
231274_s_at	ミトコンドリア溶質担体タンパク質	MSCP	R92925	1.2	1.3	1.4	193
1558732_at	マイトジェン-活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ4	MAP4K4	AK074900	0.8	0.8	0.6	128

10

20

30

40

【表 5 0】

223218_s_at	リボ多糖類により誘導されるアンキリン反復を有する分子(MAIL), マウスの相同体	MAIL	AB037925	0.8	0.8	0.7	708
243683_at	死亡因子 4 様 2	MORF4L2	H43976	0.8	0.9	0.7	65
1563469_at	MRNA; cDNA DKFZp313M0417 (クローン DKFZp313M0417から)		AL832681	0.6	0.8	0.6	74
234224_at	MRNA; cDNA DKFZp43400919 (クローン DKFZp43400919から)		AL137541	0.8	0.7	0.7	79
227576_at	MRNA; cDNA DKFZp686K1098 (クローン DKFZp686K1098から)		AW003140	0.8	0.7	0.8	452
228217_s_at	MRNA; cDNA DKFZp686P09209 (クローン DKFZp686P09209から)		BF973374	1.4	1.3	1.4	365
210210_at	ミエリンタンパク質ゼロ様 1	MPZL1	AF181660	1.8	2.4	1.4	105

10

20

30

【表 5 1】

233539_at	N-アシル-ホスファチジルエタノールアミン-加水分解性ホスホリパーゼ D	NAPE-PLD	AK000801	1.0	0.8	0.7	135
202000_at	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノン) 1 アルファサブコンプレックス, 6, 14kDa	NDUFA6	BC002772	0.8	0.9	0.7	693
218320_s_at	ニューロンタンパク質 17.3	P17.3	NM_019056	1.0	1.4	1.8	993
233626_at	ニューロピリン 1	NRP1	AK024580	1.2	1.4	1.8	53
235985_at	nj45a06. x5 NCI_CGAP_Pr9 ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:995410類似-A1u反復エレメントを含む;エレメントTAR1反復エレメントを含む; mRNA 配列		AI821477	1.3	1.4	1.6	115
226991_at	活性化T細胞の核因子, 細胞質, カルシニューリン-依存的 2		AA489681	1.1	1.4	1.7	88
209505_at	核 受容体サブファミリー 2, F群, 構成員 1	NR2F1	AI951185	1.2	1.5	1.4	499

10

20

30

40

【表 5 2】

206302_s_at	nudix (ヌクレオシドニリン酸結合部分X)-型モチーフ 4	NUDT4	NM_019094	0.9	0.7	0.7	955
244450_at	oc86a09.s1 NCI_CGAP_GCB1 ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:1356568 3' 、gb:M81181 ナトリウム/カリウム輸送性ATPアーゼベータ-2 (ヒト)と類似;エレメントPTR5反復エレメントを含む;, mRNA 配列.		AA741300	1.4	1.4	1.4	65
238408_at	酸化抵抗性 1	OXR1	AW086258	1.0	0.8	0.7	84
205336_at	パルブアルブミン	PVALB	NM_002854	1.4	1.7	1.9	319
220303_at	PDZ ドメイン含有 2	PDZK2	NM_024791	1.3	1.4	1.5	95
204300_at	PET112-様 (酵母)	PET112L	NM_004564	1.3	1.3	1.5	205
209504_s_at	プレクストリン相同性ドメイン含有, ファミリー B (エベクチン) 構成員 1	PLEKHB1	AF081583	0.9	0.7	0.7	144
242922_at	pM5 タンパク質 (nomo)	PM5	AU151198	1.2	1.4	1.5	60
236407_at	カリウム電圧-ゲートチャンネル, Isk-関連ファミリー, 構成員 1	KCNE1	R73518	1.3	1.5	1.5	127
1568706_s_at	Pp12719 mRNA, 完全cds		AF318328	1.3	1.6	1.5	96

10

20

30

40

【表 5 3】

1558017_s_at	PRKC, アポトーシス, WT1, 調節因子	PAWR	BG109597	1.1	1.1	1.6	179
229158_at	プロテインキナーゼ, リシン欠損 4	PRKWNK4	AW082836	1.2	1.2	1.5	859
200979_at	ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(リポアミド) アルファ 1	PDHA1	BF739979	1.3	1.5	1.5	650
225171_at	Rho GTPアーゼ活性化タンパク質 18	ARHGAP18	BE644830	1.3	1.2	1.5	1407
221989_at	リボソームタンパク質 L10	RPL10	AW057781	1.4	1.4	2.0	212
1555878_at	リボソームタンパク質 S24	RPS24	AK094613	1.2	1.4	1.5	138
212030_at	RNA-結合領域 (RNP1, RRM) 含有 7	RNPC7	BG251218	1.3	1.5	1.7	293
241996_at	RUNおよびFYVEドメイン含有 2	RUFY2	AI669591	1.4	1.7	2.0	194
215028_at	sema ドメイン, 貫膜ドメイン (TM), および細胞質ドメイン, (セマホリン) 6A	SEMA6A	AB002438	1.2	1.8	1.5	63
226492_at	sema ドメイン, 貫膜ドメイン (TM), および細胞質ドメイン, (セマホリン) 6D	SEMA6D	AL036088	1.2	1.3	1.5	793

10

20

30

40

【表 5 4】

1559263_s_at	仮定的 タンパク質 D730019B10 (LOC340152)と類似, mRNA		BG397809	1.1	1.3	1.7	96
222145_at	PI-3-キナーゼ関連キナーゼ SMG-1イソ型1と類似;ラムダ/イオータプロテインキナーゼ C-相互作用性タンパク質;ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ関連プロテインキナーゼ (LOC390682), mRNA		AK027225	1.6	1.8	1.7	64
202781_s_at	骨格筋および腎臓濃厚イノシトールホスファターゼ	SKIP	AI806031	1.1	1.4	1.7	101
217591_at	SKI-様	SKIL	BF725121	1.5	1.9	1.4	114
220503_at	溶質担体ファミリー 13 (ナトリウム/硫酸共輸送体), 構成員 1	SLC13A1	AF260824	1.3	1.4	1.5	501
1559351_at	溶質担体 ファミリー 16 (モノカルボン酸輸送体), 構成員 9	SLC16A9	BI668873	0.8	0.8	0.6	138
206872_at	溶質担体 ファミリー 17 (リン酸ナトリウム), 構成員 1	SLC17A1	NM_005074	1.2	1.1	1.6	592

10

20

30

40

【表 5 5】

244353_s_at	溶質担体 ファミリー 2 (促進グルコース輸送体), 構成員 12	SLC2A12	AI675682	1.7	1.4	1.8	125
231437_at	溶質担体 ファミリー 35, 構成員 D2	SLC35D2	AA693722	1.1	1.2	1.7	120
232597_x_at	スプライシング因子, 高アルギニン/セリン 2, 相互作用性タンパク質	SFRS2IP	AK025132	1.8	1.7	1.9	499
232392_at	スプライシング因子, 高アルギニン/セリン 3	SFRS3	BE927772	1.4	1.8	2.1	565
237639_at	SRSR846		AI913600	1.4	1.6	1.6	318
204690_at	シンタキシン 8	STX8	NM_004853	1.0	1.2	1.5	622
242512_at	te33f12. x1 Soares_NhHMPu_S1 ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:2088527 3' 類似-L1. t3 L1反復 エレメントを含む; mRNA 配列.		AI382029	1.2	1.4	1.8	92
1555392_at	テストチン関連タンパク質 TRG mRNA, 完全cds		AY143171	1.2	1.1	1.7	74
221938_x_at	甲状腺ホルモン受容体関連タンパク質 5	THRAP5	AW262690	1.4	1.6	1.9	168
228793_at	甲状腺ホルモン受容体 相互作用体 8	TRIP8	BF002296	1.3	1.4	2.0	395

10

20

30

40

【表 5 6】

232017_at	密着結合タンパク質 2 (zona occludens 2)	TJP2	AK025185	1.1	1.2	1.5	118
228971_at	転写配列、タンパク質ref:NP_055301.1 (ホモサピエンス) ニューロンスレックタンパク質[ホモサピエンス]と中程度の類似性を示す		AI357655	1.0	1.2	1.6	704
233518_at	転写配列、タンパク質 ref:NP_071431.1 (ホモサピエンス) サイトカイン受容体様因子 2と中程度の類似性を示す; サイトカイン受容体 CRL2前駆体[ホモサピエンス]		AU144449	0.8	0.6	0.7	74
241798_at	転写配列、タンパク質 sp:P39195 (ホモサピエンス) と中程度の類似性を示す, ALU8_HUMAN Aluサブファミリー SX配列 コンタミネーション警告エントリー		AI339930	1.3	1.5	1.5	69

10

20

30

【表 5 7】

243256_at	転写配列, タンパク質 ref:NP_060265.1(ホモサピエンス)と弱い類似性を示す, 仮定的タンパク質FLJ20378[ホモサピエンス]		AW796364	1.3	1.3	1.6	157
239735_at	転写配列, タンパク質ref:NP_060312.1(ホモサピエンス)と弱い類似性を示す, 仮定的タンパク質FLJ20489[ホモサピエンス]		N67106	0.7	0.5	0.5	150
242191_at	転写配列, タンパク質 ref:NP_060312.1(ホモサピエンス)と弱い類似性を示す, 仮定的タンパク質FLJ20489[ホモサピエンス]		AI701905	1.3	1.4	1.7	174
242490_at	転写配列, タンパク質 ref:NP_062553.1(ホモサピエンス)と弱い類似性を示す, 仮定的タンパク質FLJ11267[ホモサピエンス]		AA564255	1.2	1.2	1.6	165

10

20

30

40

【表 5 8】

241897_at	転写配列, タンパク質 ref:NP_071431.1 (ホモサピエンス)と弱い類似性を示す, サイトカイン受容体様因子2; サイトカイン受容体CRL2前駆体[ホモサピエンス]		AA491949	1.3	1.5	1.9	492
230590_at	転写 配列		BE675486	0.9	0.8	0.7	107
230733_at	転写 配列		H98113	0.7	0.6	0.6	127
230773_at	転写 配列		AA628511	1.1	1.3	1.6	131
236432_at	転写 配列		AA682425	0.7	0.6	0.6	70
237317_at	転写 配列		AW136338	1.0	0.7	0.7	79
238875_at	転写 配列		BE644953	1.4	2.3	2.2	75
239238_at	転写 配列		AI208857	1.4	1.2	1.4	113
240128_at	転写 配列		H94876	1.2	1.3	1.6	54
241837_at	転写 配列		AI289774	1.2	0.9	0.6	59
241936_x_at	転写 配列		AI654130	1.6	1.7	1.7	175
241940_at	転写 配列		BF477544	1.1	1.2	1.5	63
242299_at	転写 配列		AW274468	1.2	1.2	1.7	82
242536_at	転写 配列		AI522220	0.8	0.8	0.7	533
242579_at	転写 配列		AA935461	1.2	1.3	2.0	270
242673_at	転写 配列		AA931284	0.6	0.5	0.7	99
243591_at	転写 配列		AI887749	1.3	1.2	1.7	106
243675_at	転写 配列		BF512500	1.4	1.5	1.6	81
243933_at	転写 配列		AI096634	1.3	1.7	2.1	142
244414_at	転写 配列		AI148006	1.1	1.4	1.9	439
244674_at	転写 配列		AA936428	2.8	2.5	1.7	131
244797_at	転写 配列		AI269245	1.2	1.2	1.5	168

10

20

30

40

【表 5 9】

224566_at	栄養膜由来非コーディング RNA	TncRNA	AI042152	1.3	1.6	1.5	1769
204141_at	チューブリン, ベータ ポリペプチド	TUBB	NM_001069	1.2	1.1	1.5	1453
202510_s_at	腫瘍壊死因子, アルファ-誘導タンパク質 2	TNFAIP2	NM_006291	1.4	1.2	1.6	211
232141_at	U2(RNU2)小核RNA補助因子 1	U2AF1	AU144161	1.3	1.4	1.9	109
228142_at	ユビキノール-シトクロム c レダクターゼ複合体 (7.2 kD)	HSPC051	BE208777	1.5	1.6	1.7	177
1557409_at	UI-CF-FN0-aex-p-22-0-UI. s1 UI-CF-FN0 ホモサピエンス cDNA クローン UI-CF-FN0-aex-p-22-0-UI 3', mRNA 配列.		CA313226	1.0	1.2	1.3	124
1558801_at	無名タンパク質産物; ホモサピエンス cDNA FLJ31207 fis, クローン KIDNE2003357.		AK055769	1.2	1.6	1.6	169
225198_at	VAMP (小胞関連膜タンパク質)-関連タンパク質 A, 33kDa	VAPA	AL571942	1.1	1.4	1.6	658
222303_at	v-ets 赤芽球症ウイルス E26 発癌遺伝子相同体 2 (鳥類)	ETS2	AV700891	1.8	1.9	2.3	177

10

20

30

【表 6 0】

235850_at	WD 反復 ドメイン 5B	WDR5B	BF434228	1.3	1.9	2.5	289
229647_at	wh65e08. x1 NCI_CGAP_Kid11 ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:2385638 3',類似-A1u反復 エレメントを含む ;エレメントMER22 反復エレメントを 含む;, mRNA 配列 .		AI762401	1.1	1.2	1.6	793
242406_at	w147a04. x1 NCI_CGAP_Ut1 ホ モサピエンス cDNA クローン IMAGE:2428014 3', mRNA 配列.		AI870547	1.0	1.0	1.6	126
224590_at	X (不活性)-特異 的転写物	XIST	BE644917	2.0	2.0	2.2	261
1565454_at	XAGE-4 タンパク 質	XAGE-4	AJ318895	0.7	0.6	0.7	119
230554_at	生体内異物/中鎖 脂肪酸:CoA リガ ーゼ	LOC348158	AV696234	1.3	1.4	1.5	5210

10

20

30

【表 6 1】

238913_at	xm54d01.x1 NCI_CGAP_GC6 ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:2688001 3', 類似-Alu反復エレメントを含む; エレメントMER28 MER28反復エレメントを含む;, mRNA 配列.		AW235215	1.3	1.6	1.6	111
222281_s_at	xs86h03.x1 NCI_CGAP_Ut2 ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:2776565 3', 類似-Alu反復エレメントを含む; エレメントMER38 反復エレメントを含む;, mRNA配列.		AW517716	1.5	1.6	1.8	350
234033_at	yd35c06.s1 Soares 胎児肝臓脾臓 1NFLSホモサピエンスcDNAクローン IMAGE:110218 3', mRNA配列.		T71269	1.1	1.2	1.6	130
239654_at	ye62h04.s1 Soares 胎児肝臓脾臓 1NFLS ホモサピエンスcDNAクローン IMAGE:122359 3', mRNA 配列.		T98846	1.1	1.3	1.6	139

10

20

30

40

【表 6 2】

242241_x_at	yi33f06. s1 Soares胎盤Nb2HP ホモサピエンス cDNA クローン IMAGE:141059 3', 類似-Alu反復エ レメントを含む ;L1反復エレメン トを含む; mRNA 配列.		R66713	1.2	1.4	1.6	73
232216_at	YME1-様1サッカロ マイシス・セレヴ イシエ(S. cerevisiae)	YME1L1	AA828049	1.4	1.5	1.6	70
1565566_a_at	yn76g07. s1 Soares 成人脳 N2b5HB55Y ホモサ ピエンス cDNA ク ローン IMAGE:174396 3', 類似-Alu反復エ レメントを含む;, mRNA 配列.		H21394	1.8	1.8	1.5	84
217586_x_at	yy28g05. s1 Soaresメラノサイ ト2NbHM ホモサピ エンス cDNA クロ ーン IMAGE:272600 3', 類似-Alu反復エ レメントを含む;, mRNA 配列.		N35922	1.3	1.2	1.6	370

10

20

30

40

【表 6 3】

226163_at	亜鉛 フィンガー およびBTB ドメイ ン含有 9	ZBTB9	AW291499	1.1	1.2	1.5	159
1569312_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 146	ZNF146	BE383308	0.9	0.6	0.7	85
231848_x_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 207	ZNF207	AW192569	1.0	1.2	1.5	344
239937_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 207	ZNF207	AI860558	1.1	1.9	1.6	128
229279_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 432	ZNF432	AW235102	1.4	1.4	1.6	93
215012_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 451	ZNF451	AU144775	1.3	2.1	2.6	153
219741_x_at	亜鉛 フィンガー タンパク質 552	ZNF552	NM_024762	1.2	1.3	1.7	184
230503_at	zo02d03.s1 Stratagene結腸 (#937204) ホモサ ピエンス cDNA ク ローン IMAGE:566501 3', mRNA 配列.		AA151917	0.7	0.7	0.7	159

10

20

30

【 0 1 7 1 】

－実施態様において、グローバル分析を用いて同定される好ましい遺伝子には、セルロプラスミン (Chen et al., Biochem, Biophys Res Commun. (2001); 282; 475-82)、pM5/NOMO (Ju et al., Mol. Cell. Biol. (2006); 26; 654-67)、コロニー刺激因子2受容体 (Steinman et al., Annu Rev. Immunol. (1991); 9; 271-96)、Hairy and enhancer of split-1 (Hes-1) (Deregowski et al., J. Biol. Chem. (2006))、インスリン増殖因子結合タンパク質4 (Jehle et al., Kidney Int. (2000); 57; 1209-10)、肝細胞増殖因子 (ヘパポイエチンA) (Azuma et al., J. Am. Soc. Nephrol. (2001); 12; 1280-92)、溶質担体ファミリー2 (Linden et al., Am. J. Physiol. Renal. Physiol. (2006) 1月; 290(1): F205-13. Epub 2005年8月9日)、ski様 (snoN) (Zhu et al., Mol. Cell. Biol. (2005) 12月; 25(24): 10731-44)があるが、これらに限定されるわけではない。

40

【 0 1 7 2 】

4. 検討

CANの予測/早期診断用のゲノムバイオマーカーを同定することを目標として、腎臓同種移植プロトコル生検材料の遺伝子発現プロファイリングを実施した。バイオマーカーは、組織学的パラメーターによりCANが明白となる18週および/または12週前に潜在的CANグレードIを診断する分子ツールとして有用である。

50

【 0 1 7 3 】

連続腎臓プロトコル生検材料からの遺伝子発現データの統計分析により、C A N I の予測 / 早期診断バイオマーカーが同定され得た。個々のバイオマーカーモデルを、

- C A N の臨床 / 組織病理学的徴候が現れる 4 . 5 か月前
- C A N の臨床 / 組織病理学的徴候が現れる 3 か月前
- 様々な時点および診断

について作製した。

【 0 1 7 4 】

バイオマーカー変数（すなわち、プローブセット）は、個々の時点、この場合 C A N I の組織病理学的診断が下される 4 . 5 か月および 3 か月前では全く異なる。バイオマーカーの有効性は、新しいデータセットでのバリデーションにより証明されなければならない。C A N の発現に関与する分子レベルでの生物学的過程を明らかにするため、

- 一時的に発現された遺伝子およびネットワーク、および
 - C A N で存在する遺伝子、そこでの発現および遡って早期時点までの経路の追跡
- に焦点をあてて分析を実施する。

【 0 1 7 5 】

均等な事物

本発明は、本明細書に記載した特定実施態様に関して制限されるのではなく、それらの態様は単に本発明の個々の態様の説明に過ぎないものとする。当業者には明白なことであるが、本発明の精神および範囲から逸脱しない限り、多くの修正および変形が加えられ得る。本発明の範囲内における機能的に均等内容の方法および装置は、本明細書で列挙されているものに加えて、前述の記載内容から当業者には容易に理解できるものである。上記の修正および変形も、添付の請求の範囲内に包含されるものとする。本発明は、請求の範囲に従う均等内容事項の全範囲と一緒に、添付の請求の範囲によってのみ制限される。

【 0 1 7 6 】

表 1 2 : バイオマーカー同定 : 1 2 週 (C A N の 3 か月前) *

10

20

【表 6 4】

Affymetrix プローブセッ ト I D	説明	一般名	変化 率
201792_at	A E結合タンパク質 1	AEBP1	1.89
211712_s_at	アネキシン A 9	ANXA9	0.55
207367_at	A T Pアーゼ、H ⁺ /K ⁺ 輸送性、非胃性、アルファポリペプチド	ATP12A	0.50
229218_at	コラーゲン、I型、アルファ2	COL1A2	2.43
232458_at	コラーゲン、III型、アルファ1 (エーレルス-ダンロー症候群V型、常染色体優性)		2.79
201438_at	コラーゲン、VI型、アルファ3	COL6A3	2.13
226237_at	コラーゲン、VIII型、アルファ1	COL8A1	2.17
227336_at	Deltex相同体 1 ショウジョウバエ (Drosophila)	DTX1	0.50
210165_at	デオキシリボヌクレアーゼ	DNASE1	0.42
220625_s_at	E74様因子 5 (etsドメイン転写因子)	ELF5	0.45
221870_at	EH-ドメイン含有 2	EHD2	2.40
227353_at	ゆう贅状表皮発育異常症 2	EVER2	3.20
242974_at	Frizzled相同体 9 ショウジョウバエ (Drosophila)	FZD9	2.46
211795_s_at	FYN結合タンパク質 (FYB-120/130)	FYB	2.26
201744_s_at	ルミカン	LUM	1.95
229554_at	ルミカン	LUM	2.67
227438_at	リンパ球アルファキナーゼ	LAK	3.00
226841_at	マクロファージ発現遺伝子 1	MPEG1	2.00
212999_x_at	主要組織適合性遺伝子複合体、クラスII、DQベータ 1	HLA-D QB1	2.49
226210_s_at	母系発現 3	MEG3	2.34
212012_at	メラノーマ関連遺伝子	D2S448	1.71
219666_at	貫膜 4 -ドメイン、サブファミリーA、構成員 6 A	MS4A6A	1.94
228055_at	ナプシンB偽遺伝子	NAP1L	1.93
214111_at	オピオイド結合タンパク質/細胞接着分子様	OPCML	0.40
205267_at	POUドメイン、クラス 2、会合因子 1	POU2AF 1	4.04
216834_at	G-プロテインシグナリング 1 の調節因子	RGS1	2.69
218870_at	Rho GTPアーゼ活性化タンパク質 1 5	ARHGA P15	2.52
209374_s_at	免疫グロブリン重定常 m u	IGHM	8.84
203083_at	トロンボスポンジン 2	THBS2	2.23
209960_at	肝細胞増殖因子 (HGF)	HGF	2.00
202664_at	ヴィスコット-オールドリッチ症候群タンパク質相 相互作用性タンパク質	WASPIP	1.96

10

20

30

40

* 機能的に注をつけていないプローブセットを省かないバイオマーカーのプローブセット

【 0 1 7 7 】

表 1 3 : 1 2 週 (C A N の組織学的診断の 3 か月前) : 免疫関連遺伝子の過剰出現

50

【表 6 5】

Affymetrix ID	遺伝子名	FC	t検定
213539_at	CD 3 D 抗原、デルタポリペプチド (T i T 3 複合体)	2.5	1.3E-02
210031_at	CD 3 Z 抗原、ゼータポリペプチド (T i T 3 複合体)	2.1	1.4E-02
212063_at	CD 4 4 抗原 (回帰機能およびインド血液群系)	2.1	8.2E-02
204118_at	CD 4 8 抗原 (B細胞膜タンパク質)	1.7	6.1E-02
213958_at	CD 6 抗原	2.3	2.8E-02
206978_at	ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体 2	2.3	6.4E-03
206337_at	ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体 7	2.0	7.4E-02
205898_at	ケモカイン (C-X 3-Cモチーフ) 受容体 1	2.0	4.4E-03
217028_at	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) 受容体 4	2.1	1.1E-01
224733_at	ケモカイン様因子スーパーファミリー 3	1.4	2.9E-01
224998_at	ケモカイン様因子スーパーファミリー 4	0.6	4.3E-03
211339_s_at	I L 2 -誘導性 T 細胞キナーゼ	2.1	2.6E-02
232024_at	免疫関連タンパク質 2	1.7	9.6E-02
211430_s_at	免疫グロブリン重定常ガンマ 3 (G 3 m マーカー)	8.5	2.9E-02

10

20

30

【表 6 6】

209374_s_at	免疫グロブリン重定常m u	25.6	1.2E-02
212827_at	免疫グロブリン重定常m u	1.6	1.2E-01
212592_at	免疫グロブリンJポリペプチド、免疫グロブリンalp についてのリンカータンパク質	9.9	1.9E-02
214677_x_at	免疫グロブリンラムダ結合性3	10.7	3.5E-02
215121_x_at	免疫グロブリンラムダ遺伝子座	14.8	5.4E-02
209031_at	免疫グロブリンスーパーファミリー、構成員4	0.5	1.2E-02
226818_at	マクロファージ発現遺伝子1	2.4	2.8E-02
226841_at	マクロファージ発現遺伝子1	2.7	1.1E-04
211654_x_at	主要組織適合性遺伝子複合体、クラスII、DQベータ1	1.8	5.9E-02
212999_x_at	主要組織適合性遺伝子複合体、クラスII、DQベータ1	2.9	6.3E-03
209312_x_at	主要組織適合性遺伝子複合体、クラスII、DRベータ3	1.7	1.0E-01
204670_x_at	主要組織適合性遺伝子複合体、クラスII、DRベータ4	1.6	5.0E-03
208306_x_at	主要組織適合性遺伝子複合体、クラスII、DRベータ4	1.6	9.6E-03
202687_s_at	腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー、構成員10	1.7	2.0E-01
214329_x_at	腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー、構成員10	1.5	1.5E-01
204781_s_at	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、構成員6	1.7	2.7E-02
202510_s_at	腫瘍壊死因子、アルファ誘導タンパク質2	1.6	8.4E-02
202644_s_at	腫瘍壊死因子、アルファ誘導タンパク質3	1.6	8.2E-02
206026_s_at	腫瘍壊死因子、アルファ誘導タンパク質6	2.8	4.4E-02
210260_s_at	腫瘍壊死因子、アルファ誘導タンパク質8	1.7	3.7E-03

10

20

30

40

【0178】

表 1 4 : 1 2 週 (C A N の 組 織 学 的 診 断 の 3 か 月 前) : E C M 関 連 遺 伝 子 の 過 剰 出 現

【表 6 7】

Affymetrix ID	遺伝子名	F C	T検定
1556499_s_at	コラーゲン、I型、アルファ1	1.5	8.0E-02
202403_s_at	コラーゲン、I型、アルファ2	1.7	3.2E-02
202404_s_at	コラーゲン、I型、アルファ2	2.0	3.1E-02
229218_at	コラーゲン、I型、アルファ2	2.3	6.4E-03
201852_x_at	コラーゲン、III型、アルファ1 (エーレルス-ダンロー症候群タイプIV、常染色体)	2.1	1.7E-02
215076_s_at	コラーゲン、III型、アルファ1 (エーレルス-ダンロー症候群タイプIV、常染色体)	1.7	1.4E-02
212488_at	コラーゲン、V型、アルファ1	2.0	1.5E-02
212489_at	コラーゲン、V型、アルファ1	1.6	5.2E-02
209156_s_at	コラーゲン、VI型、アルファ2	2.2	6.9E-02
201438_at	コラーゲン、VI型、アルファ3	2.3	2.6E-03
226237_at	コラーゲン、VIII型、アルファ1	2.8	2.1E-02

10

20

【表 6 8】

212865_s_at	コラーゲン、XIV型、アルファ1 (ウンデュリン)	1.7	9.9E-03
204345_at	コラーゲン、XVI型、アルファ1	1.6	1.1E-02
201893_x_at	デコリン	1.6	4.2E-02
209335_at	デコリン	1.5	3.8E-02
211813_x_at	デコリン	1.5	2.1E-01
211896_s_at	デコリン	1.7	3.0E-02
210495_x_at	フィブロネクチン1	1.5	2.1E-01
211719_x_at	フィブロネクチン1	1.5	2.4E-01
212464_s_at	フィブロネクチン1	1.5	2.2E-01
218255_s_at	フィブロシン1	0.6	1.2E-03

30

40

【表 6 9】

202995_s_at	フィブリン1	2.0	1.6E-02
202994_s_at	フィブリン1	1.6	8.8E-02
201744_s_at	ルミカン	1.9	2.2E-02
229554_s_at	ルミカン	2.9	8.4E-04
204259_s_at	マトリックスメタロプロテインナーゼ7 (マトリリシン、ウ テリン)	1.8	2.3E-01

10

【0179】

表 15 : 「グローバル分析」に関する概観。

【表 7 0】

目的:	様々な時点および診断全般におけるバイオマーカーモデルの同定
サンプル:	33 N、未発症者(「N」)からのサンプル 8 前CAN、6週(「06週 前CAN」) 8 前CAN、12週(「12週 前CAN」) 18 CANグレードI(6、12および24週)(「CAN」) 合計 : 67サンプル
正規化:	各群をNサンプルのメディアンに対して正規化、バッチによる
フィルター:	分散係数: 小 (< 20%、群N中) 未処理発現値 > 100、全サンプルの > 25%中
分析:	SIMCA (OSC、すなわち直交シグナル補正による 部分最小二乗法)

20

【0180】

表 16 : グローバル分析からの遺伝子の抜粋

【表 7 1】

Affymetrix ID	遺伝子名	役割	変化率
223679_at	カテニン (カドヘリン関連タンパク質)、ベータ 1、88 kDa	Wnt 経路 ; EMT	↑
228143_at	セルロプラスミン (フェロキシダーゼ)	銅担体、ネフローゼ症候群では血清中で上昇	↑
225288_at	コラーゲン、XXVII型、アルファ1	ECM	↑
1156820_a_at	リンパ性白血病で欠失、2		↑
210165_at	デオキシリボヌクレアーゼ 1	腎細管損傷	↓
227353_at	ゆう贅状表皮発育異常症 2		↑
203394_s_at	hairy and enhancer of split 1、シヨウジョウバエ (Drosophila)	Notchシグナリング ; T細胞 ; プロスタグランジンシンターゼの調節	↓
209960_at	HGF(AA1-728)	TGFベータと拮抗 ; 間質性炎症を軽減 ; EMTを阻害	↑
212827_at	IgM重鎖完全配列	免疫応答	↑
242903_at	インターフェロンガンマ受容体 1		↑
227438_at	リンパ球アルファキナーゼ	上皮極性の維持	↑
226841_at	マクロファージ発現遺伝子 1		↑
226991_at	活性化T細胞の核因子、細胞質、カルシニューリン-依存性 2	高グルコースに対する動脈平滑筋応答についての潜在的代謝センサー ; 免疫応答	↑

10

20

30

【表 7 2】

206302_s_at	nudix (ヌクレオシド二リン酸結合部分X) -タイプモチーフ 4	ピロリン酸ヒドロラーゼ	↓
1558017_s_at	前立腺アポトーシス応答-4タンパク質	WT1と相互作用 ; アポトーシス	↑
217591_at	SKI様	TGFベータ経路 ; Smad3と相互作用	↑
221938_x_at	甲状腺ホルモン受容体関連タンパク質 5		↓
228793_at	甲状腺ホルモン受容体相互作用因子 8		↑
224556_at	栄養膜MHCクラスII抑制因子	非コーディングRNA ; MHCクラス発現を抑制	↑
202510_s_at	腫瘍壊死因子、アルファ誘導タンパク質 2		↑

40

50

【図面の簡単な説明】

【0181】

【図1】組織病理学的評価による安定した同種移植片機能（正常、N）および慢性同種移植片拒絶（CAN）の診断に関する生検試料の時間推移の詳細を示した概要図。

【図2】バイオマーカー06週で得られたバイオマーカーデータの部分最小二乗法判別分析（PLDA）により得られた散布図。

【図3】実測対予測バイオマーカーデータを比較するバイオマーカー06週で得られたデータのPLSDAにより得られたグラフ。

【図4】バイオマーカー06週PLSDAモデル：Validation by Response Permutation（応答並べ替えによるバリデーション）に関するバイオマーカーデータのグラフ。

【図5】バイオマーカー12週で得られたバイオマーカーデータの直交部分最小二乗法分析（OPLS）により得られた散布図。

【図6】バイオマーカー12週OPLSモデル：「応答並べ替えによるバリデーション」に関するバイオマーカーデータのグラフ。

【図7】実測対予測バイオマーカーデータを比較するバイオマーカー12週で得られたデータのOPLSにより得られたグラフ。

【図8】バイオマーカー06週で得られたバイオマーカーデータのPLDAにより得られた散布図。

【図9】バイオマーカー12週PLSDAモデル：「応答並べ替えによるバリデーション」に関するバイオマーカーデータのグラフ。

【図10】実測対予測バイオマーカーデータを比較するバイオマーカー12週で得られたデータのOPLSにより得られたグラフ。

【図11】バイオマーカーデータのグローバル分析における直交シグナル補正（OSC）により得られた散布図。

【図12】バイオマーカーグローバル分析OSCモデル：「応答並べ替えによるバリデーション」に関するバイオマーカーデータのグラフ。

【図13】実測対予測バイオマーカーデータを比較するデータのグローバル分析OSCモデリングにより得られたグラフ。

【図14】バイオマーカーデータのグローバル分析におけるOPLSにより得られた散布図。

【図15】実測対予測バイオマーカーデータを比較するデータのグローバル分析OPLSモデリングにより得られたグラフ。

【図16】CANの臨床/組織病理学的徴候が明らかになる4.5か月前、TX後6週目の時点を示すチャート。

【図17】6週目（CANの4.5か月前）でのバイオマーカー同定のグラフ。患者群が明確に分離されている（49プローブセットによるPLSDAモデル）。

【図18】6週目（CANの4.5か月前）でのクロス-バリデーションを示すグラフ。クロス-バリデーション（「7試料のうち1群抜き」）：モデルはNと前CANを明確に分離する。

【図19】CANの臨床/組織病理学的徴候が明らかになる3か月前、TX後6週目の時点を示すチャート。

【図20】6週目（ t 検定 <0.05 、 $1.2FC$ ）および12週目（ t 検定 <0.05 、 $1.5FC$ ）で同定されたバイオマーカーのオーバーラップを示すチャート。06週目および12週目の生物学的遺伝子リスト間における小さなオーバーラップは、特定時点での異なる根元的生物学的プロセス/経路の存在を示し得る。

【図21】201プローブセットによるOSCモデルの図。201プローブセットによるOSCモデルは、時点および診断により群を区別する。

【図22】経路分析および生物学的機構を示す図。異なる時点での経路の一時的活性化。

【図23】並べ替えによるモデルバリデーションを示す図。並べ替え分析によるモデルバリデーション：100回繰り返し（すなわち、「リアルモデル」の適合度と比べた100

10

20

30

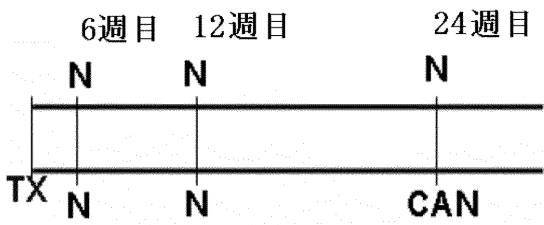
40

50

PLSモデルの適合度)。

【 図 1 】

FIG. 1

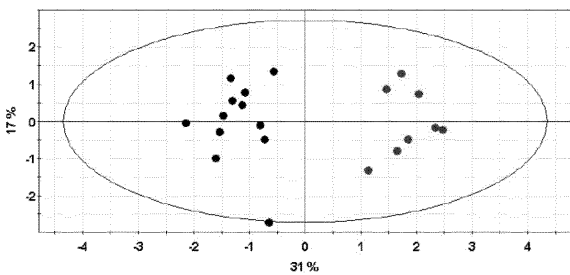


【 図 2 】

FIG. 2

MH ハノーファー
06週目 PLSDA M11.13(OPLS)
49プロブセット
[Comp. 1]/[Comp. 2]

● N
● N2-pie-CAN



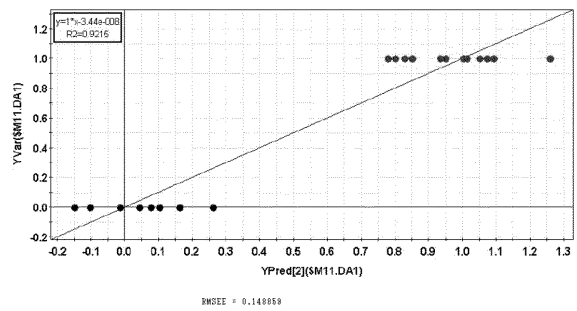
R2X(1) = 0.278306 R2X(2) = 0.188354
Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

【 図 3 】

FIG. 3

MH ハノーファー
06週 PLSDA M11 (PLS-DA), 49プロブセット
YPred[Comp. 2](YVar \$M11.DA1)/YVar(YVar \$M11.DA1)

● クラス1
● クラス2

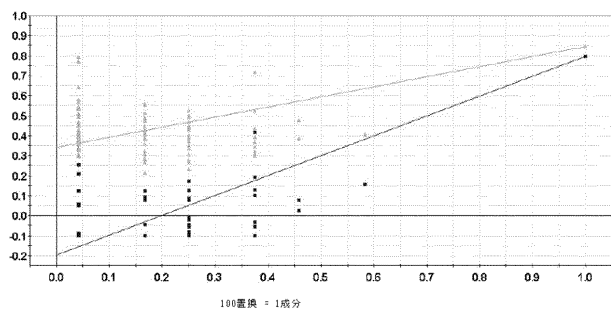


【 図 4 】

FIG. 4

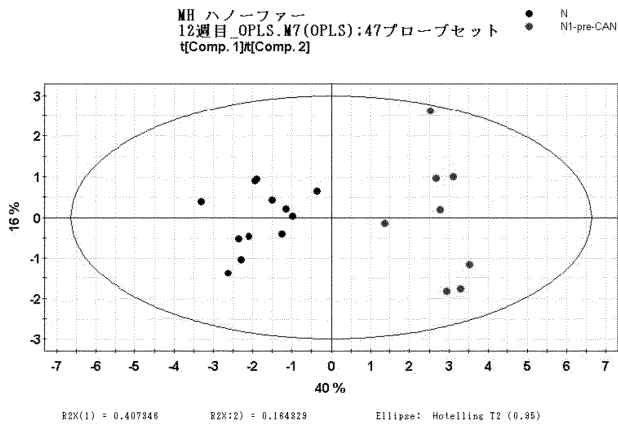
MH ハノーファー
06週 PLSDA M11 (PLS-DA): 検証モデル, 49プロブセット
SM11.DA1インターセプト: R2=(0.0, 0.34), Q2=(0.0, -0.197)

● 1
● 2



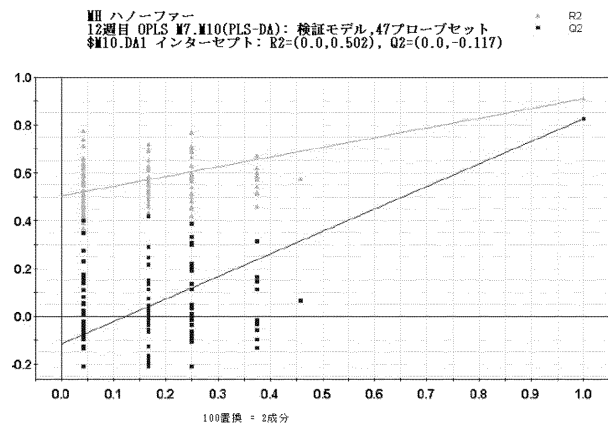
【 図 5 】

FIG. 5



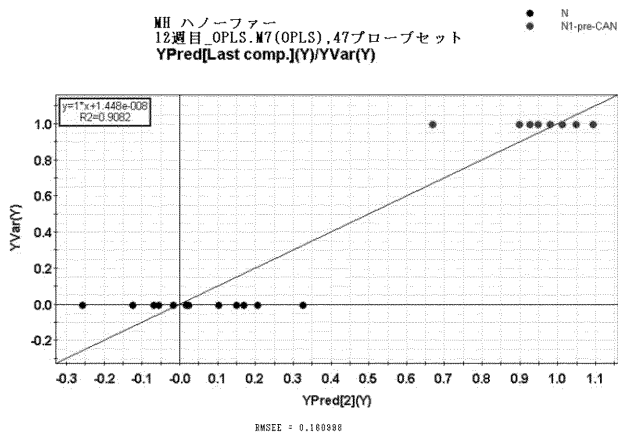
【 図 6 】

FIG. 6



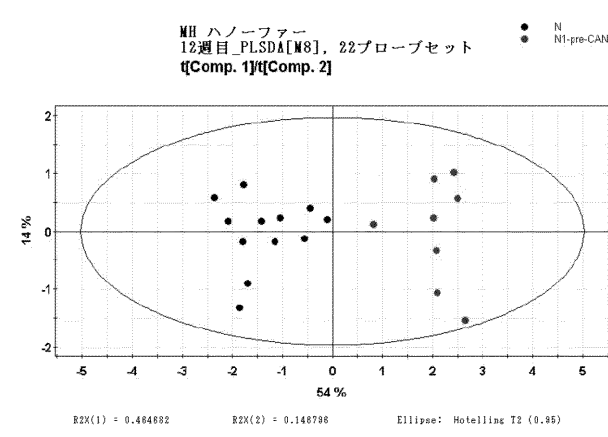
【 図 7 】

FIG. 7



【 図 8 】

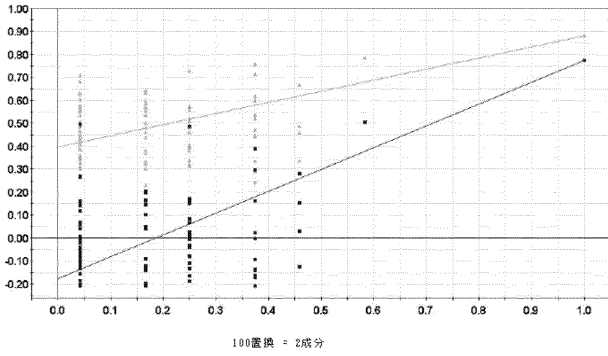
FIG. 8



【 図 9 】

FIG. 9

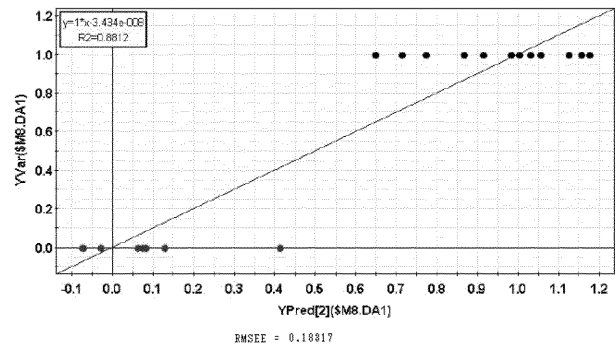
MH ハノーファー
12週目_PLS-DA.M8:検証モデル,22プローブセット
SM8.DA1インターセプト:R2=(0.0,0.397), Q2=(0.0,-0.178)



【 図 10 】

FIG. 10

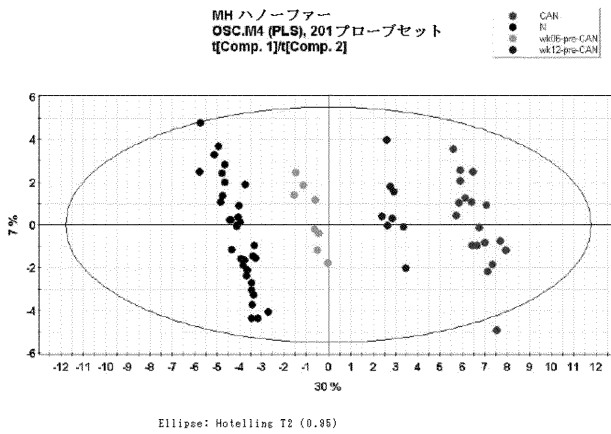
MH ハノーファー
12週目_PLSDA M8; 22プローブセット
YPred[Last comp.][\$M8.DA1]/YVar(\$M8.DA1)



【 図 11 】

FIG. 11

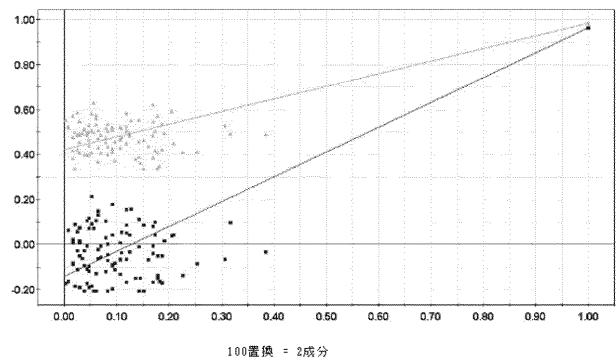
MH ハノーファー
OSC.M4 (PLS), 201プローブセット
q[Comp. 1]/q[Comp. 2]



【 図 12 】

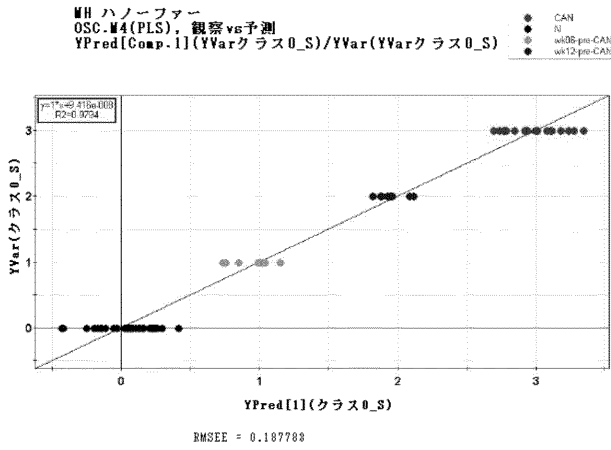
FIG. 12

MH ハノーファー
クラス区分_OSC-MS(PLS):検証モデル
クラス0_Sインターセプト:R2=(0.0,0.422), Q2=(0.0,-0.142)



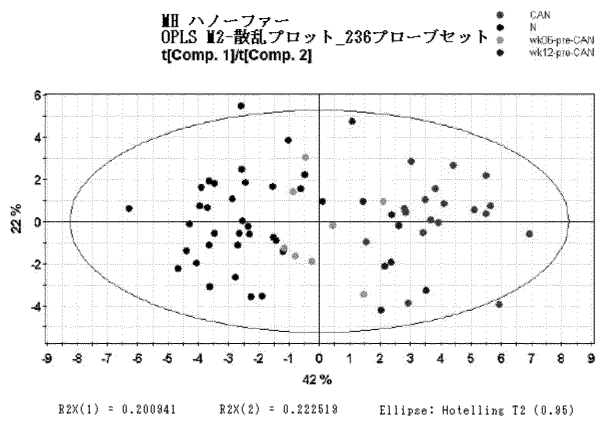
【 図 1 3 】

FIG. 13



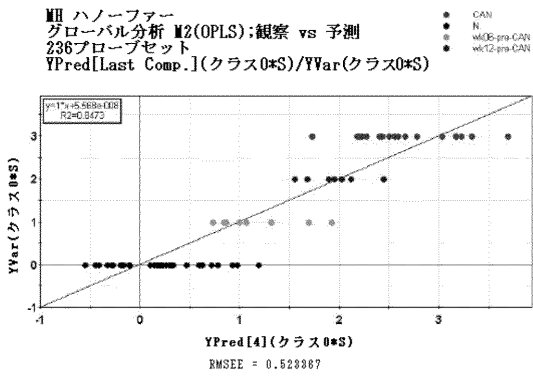
【 図 1 4 】

FIG. 14



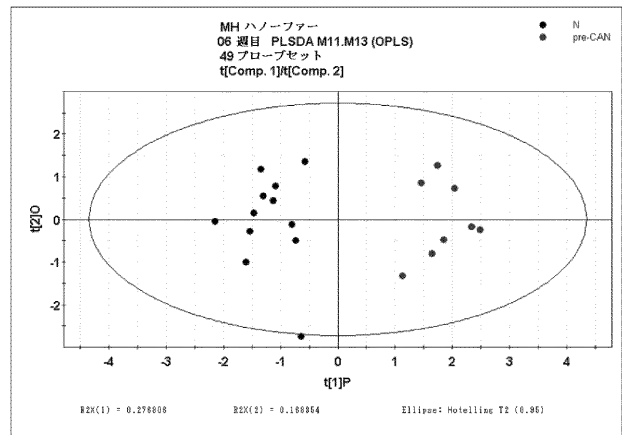
【 図 1 5 】

FIG. 15



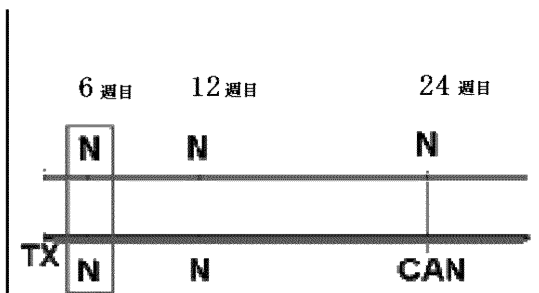
【 図 1 7 】

FIG. 17

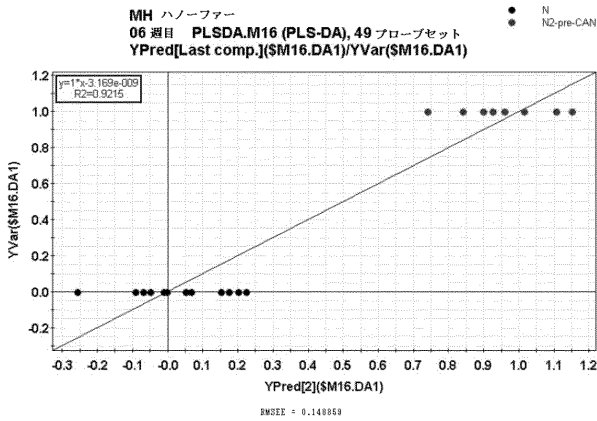


【 図 1 6 】

FIG. 16

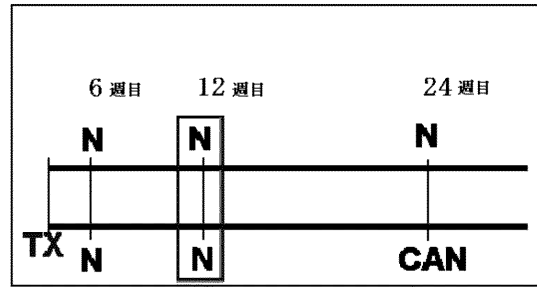


【 図 1 8 】



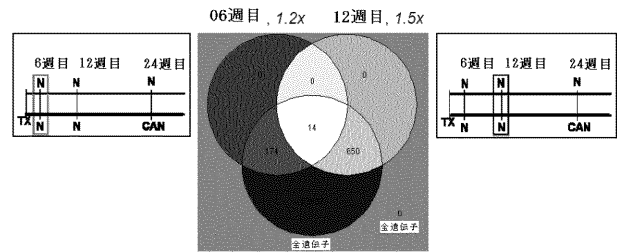
【 図 1 9 】

FIG. 19

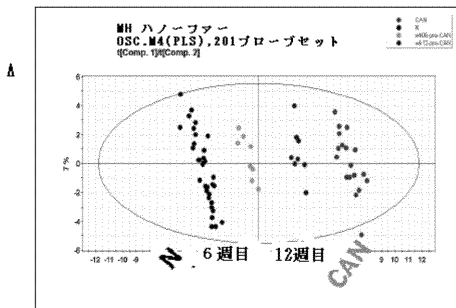


【 図 2 0 】

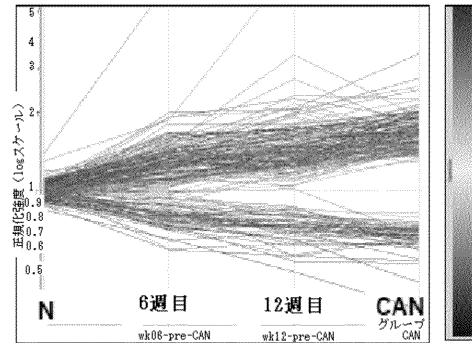
FIG. 20



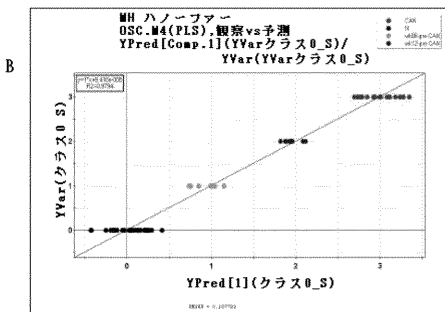
【 図 2 1 A 】



【 図 2 1 C 】

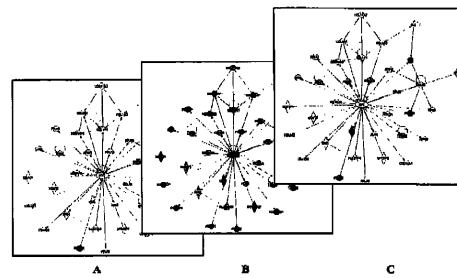


【 図 2 1 B 】



【 図 2 2 】

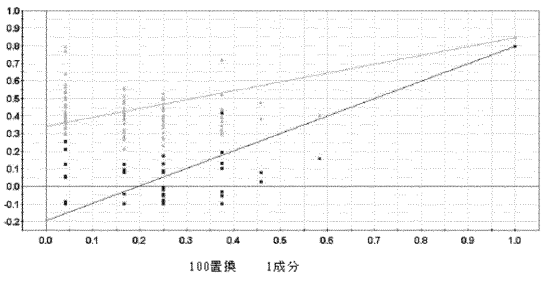
FIG. 22



【 図 2 3 】

FIG. 23

MH ハノーファー
06週目 PLS-DA. W11(PLS-DA):検証モデル, 49プロブセット
SM11. DA1インターセプト: R2=(0.0, 0.34), Q2=(0.0, -0.197)



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/002953

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCHERER A ET AL: "Early Prognosis of the Development of Renal Chronic Allograft Rejection by Gene Expression Profiling of Human Protocol Biopsies" TRANSPLANTATION, WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 75, no. 8, 27 April 2003 (2003-04-27), pages 1323-1330, XP009045201 ISSN: 0041-1337 the whole document ----- -/--	1-13, 15-21, 23,24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 July 2007		Date of mailing of the international search report 29/10/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schmitt, Anja

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2007/002953

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EIKMANS MICHAEL ET AL: "Expression of surfactant protein-C, S100A8, S100A9, and B cell markers in renal allografts: investigation of the prognostic value." JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY : JASN DEC 2005, vol. 16, no. 12, December 2005 (2005-12), pages 3771-3786, XP002443707 ISSN: 1046-6673 the whole document	1-13, 15-21, 23,24
Y	WO 2006/027192 A (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; RAULF FRIEDRICH [DE]; ROT) 16 March 2006 (2006-03-16) claims 1-14; tables 1-4 the whole document	1-13, 15-21, 23,24
Y	WO 2005/054503 A (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; BIGAUD MARC [FR]; KEHREN) 16 June 2005 (2005-06-16) claims 1-15; tables 1-3 the whole document	1-13, 15-21, 23,24
Y	FLECHNER S M ET AL: "Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes" AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION, BLACKWELL MUNKSGAARD,, DK, vol. 4, no. 9, September 2004 (2004-09), pages 1475-1489, XP002322115 ISSN: 1600-6135 the whole document	1-13, 15-21, 23,24
Y	HOTCHKISS HILARY ET AL: "Differential expression of profibrotic and growth factors in chronic allograft nephropathy." TRANSPLANTATION 15 FEB 2006, vol. 81, no. 3, 15 February 2006 (2006-02-15), pages 342-349, XP009087150 ISSN: 0041-1337 the whole document page 349; tables 2,3	1-13, 15-21, 23,24
Y	JURCEVIC S ET AL: "GENE MICROARRAYS IN TRANSPLANTATION" CURRENT OPINION IN NEPHROLOGY AND HYPERTENSION, RAPID SCIENCE, LONDON, GB, vol. 12, no. 6, 2003, pages 577-579, XP009045204 ISSN: 1062-4821 the whole document	1-13, 15-21, 23,24

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2007/002953

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PREZ-ENCISO M ET AL: "Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach" HUMAN GENETICS, BERLIN, DE, vol. 112, no. 5-6, May 2003 (2003-05), pages 581-592, XP002344508 ISSN: 0340-6717 the whole document	1-13, 15-21, 23,24
Y	NGUYEN D V: "Partial least squares dimension reduction for microarray gene expression data with a censored response" MATHEMATICAL BIOSCIENCES, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 193, no. 1, January 2005 (2005-01), pages 119-137, XP004742385 ISSN: 0025-5564 the whole document	1-13, 15-21, 23,24
Y	ERIKSSON LENNART ET AL: "Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabonomics (gpm)." ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY OCT 2004, vol. 380, no. 3, October 2004 (2004-10), pages 419-429, XP002443708 ISSN: 1618-2642 page 420 the whole document	1-13, 15-21, 23,24
Y	KETTANEH N ET AL: "PCA and PLS with very large data sets" COMPUTATIONAL STATISTICS AND DATA ANALYSIS, NORTH-HOLLAND, AMSTERDAM, NL, vol. 48, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 69-85, XP004654226 ISSN: 0167-9473 the whole document	1-13, 15-21, 23,24
A	WO 01/63441 A (TRYGG JOHAN [SE]; WOLD SVANTE [SE]) 30 August 2001 (2001-08-30) the whole document	1-13, 15-21, 23,24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/002953

Box 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.: 14, 22
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

- 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 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

- 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.:
1-13, 15-21, 23, 24 (partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2007/002953

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 14,22

Present claims 14 and 22 relate to the use of a compound "which modulates the synthesis, expression or activity of one or more genes" as identified in Table 4, 5, 6, 7 or 8.

Hence, present claims 14 and 22 relate to compounds only defined by their desired property with no indications of any kind as to their structure. The scope of said claims is thus not clear, contrary to the requirements of Art. 6 PCT.

The search with respect to claims 14 and 22 would therefore have to be limited to those compounds falling within the scope of said claims, which would be, in view of the description, clear (Art. 6 PCT).

However, the description of the present application does not disclose any such specific compound having the said property or effect: The present description merely lists a large number of known compounds or agent having immunosuppressive properties (cf. page 34, par. 2 - 35, par. 1) but does not provide any evidence that any of said large list of compounds would modulate the synthesis, expression or activity of one or more genes as identified in Table 4, 5, 6, 7 or 8.

The description of the present application further lists, on page 35, par. 2, several potentially modulating agents such as a nucleic acid, a biomarker substrate, antibody, antagonist or agonist.

However, firstly, the present application does not provide evidence that any of the biomarkers of Tables 4 - 8 would also be regulated on the protein expression level, i.e. there is no evidence that a protein modulating agent could be used in such a method.

Secondly, the present application does not disclose that the modulation of a single gene of the genes listed in any of said tables 4 - 8 would be suitable for such a method but merely discloses that specific sets of genes (see above) are to be modulated. Hence, it is neither clear nor supported in view of the description (Art. 6 PCT), how the modulation of the expression levels of a single gene (e.g. by using antisense nucleic acids specific for said single gene) could be used in a method for preventing, inhibiting, reducing or treating transplant rejection.

In view of the above objections under Art. 6 PCT, no meaningful search of claims 14 and 22 could be carried out (Article 17(2) PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/EP2007/002953

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-13, 15-21, 23, 24 (partially)

Methods for predicting the onset, monitoring, preventing, reducing or treating transplant rejection and methods for identifying agents for use in preventing, reducing or treating transplant rejection, said methods comprising determining the level of gene expression of the set of genes comprising all genes of Table 4 in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS; the use of the set of genes comprising all genes of Table 4 in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS as a biomarker for transplant rejection.

2. claims: 1-13, 15-21, 23, 24 (partially)

Methods for predicting the onset, monitoring, preventing, reducing or treating transplant rejection and methods for identifying agents for use in preventing, reducing or treating transplant rejection, said methods comprising determining the level of gene expression of the set of genes comprising the genes NFAT, Discs large 3 (dlg3) and thyroid hormone receptor alpha in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS; the use of the set of genes comprising the genes NFAT, Discs large 3 (dlg3) and thyroid hormone receptor alpha in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS as a biomarker for transplant rejection.

3. claims: 1-13, 15-20, 24 (partially)

Methods for predicting the onset, monitoring, preventing, reducing or treating transplant rejection and methods for identifying agents for use in preventing, reducing or treating transplant rejection, said methods comprising determining the level of gene expression of the set of genes comprising all genes of Table 5 in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS; the use of the set of genes comprising all genes of Table 5 in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS as a biomarker for transplant rejection.

4. claims: 1-13, 15-20, 24 (partially)

International Application No. PCT/EP2007/002953

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

ethods for predicting the onset, monitoring, preventing, reducing or treating transplant rejection and methods for identifying agents for use in preventing, reducing or treating transplant rejection, said methods comprising determining the level of gene expression of the set of genes comprising all genes of Table 6 in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS; the use of the set of genes comprising all genes of Table 6 in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS as a biomarker for transplant rejection.

5. claims: 1-13, 15-20, 24 (partially)

Methods for predicting the onset, monitoring, preventing, reducing or treating transplant rejection and methods for identifying agents for use in preventing, reducing or treating transplant rejection, said methods comprising determining the level of gene expression of the set of genes comprising the genes lumican, Smad3, AE binding protein 1 and frizzles-9 in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS; the use of the set of genes comprising the genes lumican, Smad3, AE binding protein 1 and frizzles-9 in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS as a biomarker for transplant rejection.

6. claims: 1-13, 15-20, 24 (partially)

Methods for predicting the onset, monitoring, preventing, reducing or treating transplant rejection and methods for identifying agents for use in preventing, reducing or treating transplant rejection, said methods comprising determining the level of gene expression of the set of genes comprising all genes of Table 7 in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS; the use of the set of genes comprising all genes of Table 7 in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS as a biomarker for transplant rejection.

7. claims: 1-13, 15-20, 24 (partially)

Methods for predicting the onset, monitoring, preventing, reducing or treating transplant rejection and methods for identifying agents for use in preventing, reducing or treating transplant rejection, said methods comprising determining the level of gene expression of the set of genes comprising all genes of Table 8 (11) in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS; the use of the set of genes comprising all genes of Table 8 (11) in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS as a biomarker for transplant rejection.

International Application No. PCT/EP2007/002953

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

8. claims: 1-13, 15-20, 24 (partially)

Methods for predicting the onset, monitoring, preventing, reducing or treating transplant rejection and methods for identifying agents for use in preventing, reducing or treating transplant rejection, said methods comprising determining the level of gene expression of the set of genes comprising the genes ceruloplasmin, pM5/NOMO, colony stimulating factor 2 receptor, Hes-1, insulin growth factor binding protein 4, hepatopoietin A, solute carrier family 2 and ski-like in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS; the use of the set of genes comprising the genes ceruloplasmin, pM5/NOMO, colony stimulating factor 2 receptor, Hes-1, insulin growth factor binding protein 4, hepatopofetin A, solute carrier family 2 and ski-like in combination with a predictive model selected from PLS-DA and OPLS as a biomarker for transplant rejection.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/002953

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006027192	A	16-03-2006	EP 1791974 A2	06-06-2007
WO 2005054503	A	16-06-2005	EP 1694860 A2	30-08-2006
			JP 2007520209 T	26-07-2007
WO 0163441	A	30-08-2001	AU 3785001 A	03-09-2001
			EP 1269341 A1	02-01-2003
			SE 516343 C2	17-12-2001
			SE 0000563 A	23-08-2001
			US 2003200040 A1	23-10-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 6 F 19/00 (2006.01) G 0 6 F 19/00 6 0 0

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

- 1 . フロッピー
- 2 . W I N D O W S

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QA20 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32
 QR35 QS16 QS39 QX01
 4C084 AA17 NA14 ZB08

专利名称(译)	慢性同种异体肾病的预测生物标志物		
公开(公告)号	JP2009532047A	公开(公告)日	2009-09-10
申请号	JP2009503471	申请日	2007-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
[标]发明人	アンドレアスシェーラー		
发明人	アンドレアス・シェーラー		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 A61K45/00 A61P37/06 G01N33/53 G06F19/00		
CPC分类号	A61K31/00 A61P37/06 C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2800/245 G01N2800/347 G01N2800/60		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/02 A61K45/00 A61P37/06 G01N33/53.D G06F19/00.600		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QS16 4B063/QS39 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB08		
代理人(译)	田中，三夫 山田卓司		
优先权	2006006776 2006-04-03 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及在移植排斥中调节的基因的分析 and 鉴定。基因表达的这种修饰提供了准确检测移植排斥的分子标记。

9) 日本国特許(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2009-5320 (P2009-53204)
	(43) 公表日	平成21年9月10日(2009.9.)
1) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4C084
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	
A61P 37/06 (2006.01)	A61P 37/06	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	D
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 120 頁) 最終頁に付
1) 出願番号	特願2009-503471 (P2009-503471)	(71) 出願人
2) (22) 出願日	平成19年4月2日(2007.4.2)	ノバルティス アクチエンゲゼルシャフ
3) 翻訳文提出日	平成20年12月2日(2008.12.2)	スイス国、4056 バーゼル、リヒト
4) 国際出願番号	PCT/EP2007/002953	エトラーセ 35
5) 国際公開番号	W02007/112999	(74) 代理人
6) 国際公開日	平成19年10月11日(2007.10.11)	弁理士 田中 光隆
7) 優先権主張番号	0606776.3	(74) 代理人
8) 優先日	平成18年4月3日(2006.4.3)	弁理士 山田 卓二
9) 優先権主張国	英国(GB)	(74) 代理人
		弁理士 岩崎 光隆
		(74) 代理人
		弁理士 青山 淳
		(72) 発明者
		アンドレアス・シェーラー
		ドイツ連邦共和国デー79117フラ
		ブルク、アレマンンシュトラーセ73
		最終頁に続く