

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6224585号
(P6224585)

(45) 発行日 平成29年11月1日(2017.11.1)

(24) 登録日 平成29年10月13日(2017.10.13)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Q
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
CO 7 K 7/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A
	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
	請求項の数 19 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-524448 (P2014-524448)	(73) 特許権者	505423678
(86) (22) 出願日	平成24年8月10日(2012.8.10)		エレクトロフォレティクス リミテッド
(65) 公表番号	特表2014-522990 (P2014-522990A)		イギリス国 WC 1 H 9 B B ロンドン
(43) 公表日	平成26年9月8日(2014.9.8)		マブレドン プレイス ハミルトン ハウス
(86) 国際出願番号	PCT/GB2012/051952	(74) 代理人	100097456
(87) 国際公開番号	W02013/021210		弁理士 石川 徹
(87) 国際公開日	平成25年2月14日(2013.2.14)	(72) 発明者	ブッデ, ペトラ
審査請求日	平成27年5月14日(2015.5.14)		ドイツ連邦共和国 デー-60437 フ
(31) 優先権主張番号	1113814.6		ランクフルト アム マイン, アム エン
(32) 優先日	平成23年8月10日(2011.8.10)	(72) 発明者	ツヒト, ハンス-ディーター
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		ドイツ連邦共和国 デー-30539 ハ
			ノーファー, ゲルディングシュトラーセ
			10ペー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化合物の感受性ポテンシャルを決定するための材料と方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試験化合物の感作ポテンシャルを決定する in vitro の方法であって、

- (a) 前記試験化合物を細胞と接触させるステップ；
- (b) グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 及び2以上のさらなるマーカータンパク質の発現レベルの変化を決定するステップ；および
- (c) 前記発現のレベルの変化に基づいて前記試験化合物の感作ポテンシャルを決定するステップを含み、ここで、前記GAPDHの発現のレベルの増加、及び前記2以上のさらなるマーカータンパク質の発現の存在もしくはレベルの変化は前記試験化合物が感作ポテンシャルを有することを示し、

前記2以上のさらなるマーカータンパク質が、表1、表1(A)グループ1、表1(B)グループ2、もしくは表1(C)グループ3またはそれらの組み合わせから選択され、

前記細胞が哺乳動物の皮膚細胞である、前記方法。

【請求項2】

前記哺乳動物の皮膚細胞が、初代ケラチノサイト、ケラチノサイト由来の細胞株、表皮ケラチノサイト、バルジ由来のケラチノサイト、包皮ケラチノサイト、ケラチノサイト特性を有するヒト細胞由来の細胞、HaCaT細胞株由来の細胞及びNCTC2544細胞株由来の細胞からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記2以上のさらなるマーカータンパク質が表1(A)グループ1から選択される、請求項1

又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記2以上のさらなるマーカータンパク質が表1(B)グループ2から選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

ステップ(b)がGAPDH及び2以上のさらなるタンパク質マーカーの存在または発現レベルを参照レベルと比較するステップを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

ステップ(b)が細胞を前記マーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸配列と選択的に結合する少なくとも1つの特異的結合メンバーと接触させるステップ；および前記特異的結合メンバーとマーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸配列により形成される複合体を検出および/または定量するステップを含むものである、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項7】

前記決定するステップがGAPDH及び2以上のさらなるマーカータンパク質の既知の発現レベルの標準を用いる標準曲線を準備するステップおよび試験化合物と接触させた細胞を用いて得た読取値を比較してGAPDH及び2以上のさらなるマーカータンパク質の発現レベルの変化の測定値を得るステップを含むものである、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

20

前記特異的結合メンバーが前記マーカータンパク質と特異的かつ選択的に結合する抗体またはそのフラグメントであってもよい、請求項6または請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記特異的結合メンバーがGAPDHと特異的かつ選択的に結合する自己抗体またはそのフラグメントであり、前記自己抗体は皮膚刺激またはアレルギーのある患者から得た血液サンプルから調製されたものである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

特異的結合メンバーがアプタマーである、請求項6または請求項7に記載の方法。

【請求項11】

ステップ(b)を質量分析により実施する、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項12】

ステップ(b)をタンパク質マーカー由来のペプチドに対する1以上の遷移を用いる選択反応モニタリング；

(i)試験下の細胞中のペプチドレベルを、先に細胞の感受性を表すと決定されたペプチドレベルと比較するステップ、および

(ii)GAPDH及び前記2以上のさらなるマーカータンパク質の発現の変化に基づいて試験化合物の感受性ポテンシャルを決定するステップ

により実施する、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

ステップ(i)が、既知量の対応する合成ペプチドを用いて試験下の細胞からのマーカータンパク質由来のペプチドの量を決定するステップを含み、ここで合成ペプチドは標識を除いて細胞から得られるペプチドと配列が同一である、請求項12に記載の方法。

40

【請求項14】

標識が異なる質量または重同位体のタグである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

タンパク質マーカー由来のペプチドに対する1以上の遷移が表5からの1以上の遷移を含む、請求項12～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

結合メンバーが固体支持体上に固定された、請求項6～11のいずれか1項に記載の方法。

50

【請求項 17】

試験化合物の感作ポテンシャルを *in vitro* で決定するために使用するキットであって、利用者が表1に与えられたGAPDH及び2以上のさらなるマーカータンパク質またはそれらの断片の試験下の細胞中の発現レベルを決定することを可能にするキットであり；

アッセイに適合するフォーマットの参照ペプチドのセットを含み、ここでセット中の各ペプチドは表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3あるいはそれらの組み合わせに与えられたGAPDH及び2以上のさらなるマーカータンパク質のそれぞれを一意的に表すものであり；かつ

前記細胞が哺乳動物の皮膚細胞である、前記キット。

【請求項 18】

さらに、洗浄液、希釈剤およびバッファーから成る群より選択される1以上の成分を含む、請求項17記載のキット。

【請求項 19】

アレルギーまたは刺激物質に曝された個体における、前記アレルギーまたは刺激物質による接触感作可能性または刺激可能性を診断または予後モニタリングする請求項1に記載の方法であって、前記個体から得られた細胞が用いられる、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は化合物の細胞に対する感作ポテンシャル（アレルギーポテンシャルを含む）を決定するための、細胞の *in vitro* プロテオーム分析に関する。いくつかのタンパク質マーカーが同定されていてこれらはある化合物がアレルギーまたは刺激ポテンシャルを有するかどうかを決定するための細胞に基づく分析を可能にする。特に、限定されるものでないが、本発明は試験化学物質が接触の、すなわち、皮膚における感作ポテンシャルを有するかどうかを決定するためのアッセイを提供する。

【背景技術】

【0002】

アレルギーは免疫系の1型過敏性障害である。通常のアレルギー反応は喘息および接触皮膚炎を含む。世界中でアレルギー疾患の発症は着実に増加している。アレルギー障害は患者の職業的および社会的生活に負の影響を与える。アレルギー疾患を治療する保険システムに対する費用は相当に大きく、流行に対応して増加する。アレルギー接触皮膚炎（ACD）はヒトに見られる免疫毒性の最もありふれた形態とされている。ACDはT細胞が介在する遅延型皮膚過敏症であって、通常は金属および各種の様々な化学物質および化粧品に反復曝露した後に発症する。通常は接触感作化学物質は、シナムアルデヒド（CA）、ジニトロクロロベンゼン（DNCB）、グリオキサール、オイゲノール、p-フェニレンジアミン（PPD）、およびテトラメチルチウラム（TMTD）である。PPDは広くパーマネット毛髪染剤として、繊維製品、一時的なタトゥー、写真現像剤、印刷インク、黒色ゴム、オイル、グリースおよびガソリンにおいて使用される化学物質である。

【0003】

アレルギー接触皮膚炎を引き起こす多くの職業病のアレルゲンは化学物質（またはハプテン）であって、遅延型免疫応答を引き起こすには担体タンパク質と結合しなければならない。現在、化学物質の感作ポテンシャルは動物実験、例えば、モルモット最大化試験（MagnussenおよびKligman, 1969）および局所リンパ節アッセイ（LINA）（Kimber et al. 1995）において評価されている。しかし、欧州指針（the European Directive 86/609/EEC）および化粧品指針第7回改定版（the 7th Amendment to the Cosmetics Directive 86/609/EEC）は2009年3月以後の全ての化粧成分に対して動物試験禁止を施行する。さらに市販禁止は、反復投与毒性（これについては締切期限は2013年である）を除く全ての評価項目について動物で試験した成分を含有する化粧品に対して施行されている。

【0004】

多数の研究が *in vitro* および *in silico* 予測試験方法の開発を目指して行われている。

10

20

30

40

50

しかし、接触感作化学物質の同定とスクリーニングのための認証されたin vitroアッセイは利用できるものがない。

【0005】

典型的な化学アレルゲンは低分子量であって1000ダルトン未満の質量を持ち、求電子性または親水性であって、タンパク質の求核アミノ酸と反応しうる。かかる反応性の低分子量化学物質は体内の大きい担体タンパク質と結合してハプテン-タンパク質を形成するとアレルゲンになることができる。いくつかの化学アレルゲンは元来アレルゲンでなく、アレルギー反応に加わる前に代謝変換（プロ-ハプテン）または酸化（プレ-ハプテン）を受けなければならない。例えば、オイゲノールはプロ-ハプテンと考えられるが、イソオイゲノールとPPDはプレ-ハプテンに分類される。

10

【0006】

皮膚はヒトの身体の最大器官であり、潜在的アレルギー誘発性化学物質に対して大きい接触部位を提示する。皮膚はアレルギー反応に積極的に参加するランゲルハンス細胞（LC、抗原を提示する樹状細胞）、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞およびケラチノサイトから構成される。全ての表皮細胞のほぼ95%はケラチノサイトであって、これは外来抗原と遭遇する最初の細胞である。ACDの誘導期に、化学アレルゲンは表皮タンパク質と結合してハプテン担体タンパク質複合体を形成する。ケラチノサイトは薬物代謝酵素も発現するので、プロドラッグの感作物質への転化に参加する。ケラチノサイトは化学ハプテンと接触するといくつかのサイトカイン、例えば、局所リンパ節への遊走を誘導するインターロイキン-18（IL-18）および腫瘍壊死因子（TNF- α ）を産生する。ハプテン-タンパク質複合体は樹状細胞（DC）により認識され、DCは抗原を内部化し処理しかつリンパ節へ輸送してT-リンパ球に提示する。

20

【0007】

末梢組織における外来または自己抗原の摂取とプロセッシングの後、LCは複雑な成熟プロセスを経る。それ故に、初代ケラチノサイト、ヒト不死化ケラチノサイト（HaCaT）、ヒトケラチノサイト株、例えばNCTC 2533、表皮細胞またはヒトの再建した表皮モデル、例えばEpiDerm（MatTek Corporation USA）またはEpiSkin（SkinEthic、France）を含むかかる試験系は、化学物質の感作ポテンシャルを予測する代替のアプローチを開発するために有用でありうる。

【0008】

刺激物質およびアレルゲンに対する細胞の反応は2つの主な道筋で明示される。最初の曝露はおそらく代替りの遺伝子発現を誘発し、続いて、曝された細胞のタンパク質組成の変化が起こると思われる。刺激物質またはアレルギー曝露のポテンシャルマーカーは遺伝子発現の分析を通してまたはモデル系のプロテオーム分析により見出しうることは理解されよう。本発明の主な目的は、色々なクラスの化合物に曝された細胞において増加または減少することが既知のタンパク質マーカーを提供することである。当業者は、タンパク質レベルの変化も随伴しうることおよびしばしば遺伝子発現の平行した変化が先行することを理解するであろう、そしてかかる遺伝子発現変化は本発明の範囲に含まれる。

30

【0009】

化学物質安全試験のモデル系におけるタンパク質発現変化の研究は非常に少なかったものの、刺激物質およびアレルゲンの遺伝子発現プロファイルに与える効果についてはいくつかの研究が行われている。

40

【0010】

従来の研究は、マウスおよびヒトケラチノサイト細胞株におけるサイトカインmRNA発現と産生の測定に基づくin vitro感作アッセイの開発に重点をおいてきた（Corsini et al. 2009； Van Och et al. 2005）。例えば、ヒトケラチノサイト細胞株NCTC2544は、接触感作物質の適用に対してインターロイキン-18（IL-18）の産生で応答する。対照的に、刺激および呼吸器感作物質はIL-18産生を増加しなかった（Corsini et al. 2009）。

【0011】

他の研究は様々な親電子化学物質を認識する細胞毒経路の活性化の測定に重点をおいて

50

きた。この経路は細胞センサータンパク質Kelch様ECH関連タンパク質 (Keap1) および転写因子Nrf2 (これはフェーズ2解毒遺伝子のプロモーター中の抗酸化反応配列 (ARE) と結合する) を含む (Natsch and Emter 2008; Natsch 2010)。Givaudan Fragrance Research (Duebendorf, Switzerland) はKeap2/Nrf2経路の活性化を利用してヒトKeratinSensアッセイを開発しており、このアッセイはHaCaTケラチノサイト中のAKR1C2遺伝子のAREの制御下にあるルシフェラーゼ遺伝子の発現に基づくものである (Emter et al. 2010)。試験化学物質とのインキュベーション後に、ルシフェラーゼ活性化と細胞毒性の誘導を測定して皮膚感作物質を同定するものである。KeratinSensアッセイを用いて43種の感作物質および24種の非感作物質をスクリーニングした。このシステムは38種の感作物質および19種の非感作物質を正しく同定した。偽ネガティブ感作物質の中には、リシン残基と反応する安息香酸フェニルがあり、この反応はAREに基づくアッセイにより同定されなかった (Natsch et al. 2010; Emter et al. 2010)。これは化学アレルギーの全スペクトルを同定するために、他の経路由来のさらなるバイオマーカーが必要であることを意味する。Yoshikawaら (2010) は化学感作物質とのインキュベーションに回答する遺伝子を同定するために、ヒトケラチノサイト、バルジ由来のケラチノサイト (BDK)、ヒト新生児表皮ケラチノサイト (NHEK)、およびヒト単球白血病細胞株THP-1のうちの2種の株の使用を記載している。BDK、NHEKおよびTHP-1は化学感作物質DNCEBと高反応性を示し、Nrf2経路のアップレギュレーションを伴う。しかし、インターロイキン1B (IL1B)、インターロイキン-8 (IL8) またはDNA結合インヒビター2 (ID2) を含むポテンシャルバイオマーカーの遺伝子発現は3種の細胞型の間で大きい差が観察される。例えば、IL1BおよびIL-8の遺伝子発現はTHP-1細胞と比較してBDK中のDNCEBにより遥かに高く誘導された。これは、異なる細胞型においては異なる分子経路が誘導され、従って、異なる細胞試験系においては異なるセットのバイオマーカーが必要であることを意味する。

【0012】

Vandenbrielら (2010) は、HaCaT細胞に発現する遺伝子の変化を8種の公知の感作物質および6種の刺激物質に曝したAffymetrix U133 Plus 2.0アレイを用いて分析した。サポートベクターマシーン (SVM) アルゴリズム13に基づいて、感作物質および刺激物質の間で最も判別しうる13種の遺伝子を選択したが、それには酸化ストレス経路からの遺伝子およびKeap1依存性の遺伝子が含まれた。

【0013】

従って、まだin vitroで化学安全性用の代理スクリーンとして使う最も適当な細胞株または遺伝子についてコンセンサスは存在しない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Magnusson, B., Kligman, A.M., (1969). The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. J. Invest. Dermatol. 52, 268-276.

【非特許文献2】Kimber et al. (1995). An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. Toxicology 103, 63-73.

【非特許文献3】Corsini et al. (2009). Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. Toxicol In Vitro. 23(5):789-96.

【非特許文献4】Van Och et al. (2005). Assessment of potency of allergenic activity of low molecular weight compounds based on IL-1 α and IL-18 production by a murine and human keratinocyte cell line. Toxicology. 210(2-3):95-109.

【非特許文献5】Natsch and Emter (2008). Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. Toxicol Sci. 102(1):110-9.

10

20

30

40

50

【非特許文献6】Natsch (2010). The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers--functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol Sci.* 113:284-92.

【非特許文献7】Emter et al. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 245(3):281-90.

【非特許文献8】Yoshikawa et al. (2010). Upregulation of genes orchestrating keratinocyte differentiation, including the novel marker gene ID2, by contact sensitizers in human bulge-derived keratinocytes. *J Biochem Mol Toxicol.* 24(1):10-20.

【非特許文献9】Vandenbriël et al. (2010). Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. *Toxicol Sci.* 2010 117(1):81-9.

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】

アレルギー反応にはタンパク質発現の変化が介在するという仮説から出発して、本発明者らは、公知の刺激物質および感作物質に曝したケラチノサイトの詳細なプロテオーム分析を実施して推定マーカーを明らかにした。驚いたことに、色々なクラスの化学物質への曝露にตอบสนองして変化するのが見られる従来報じられた遺伝子調節とタンパク質の間に実質的な重複は存在しなかった。結果として、本発明者らは化学物質安全性のin vitroスクリーニングにおいてアレルギーおよび皮膚刺激応答の客観的基準を果たしうる102種のタンパク質の小パネルを定義した。

20

【0016】

本発明はこれらのタンパク質マーカーのいずれか1以上の測定に基づいて、全生物試験に代わることができるin vitro方法を用いて化学感作物質を予測する方法を可能にする。

【0017】

従って、その最も一般的な方法において、本発明は表1に同定した102種のタンパク質マーカーの1以上を用いるin vitroプロテオーム分析を使って、試験化合物の感作ポテンシャルを決定する材料と方法を提供する。

【0018】

ある化合物の感作ポテンシャルは、アレルギー反応を誘発するその能力、または非アレルギー刺激物質として作用するその能力を含む。

30

【0019】

第1の態様において、試験化合物の感作ポテンシャルを決定するin vitroの方法であって、

(a) 前記試験化合物を細胞と接触させるステップ；

(b) 前記細胞中の表1から選択される1以上のマーカータンパク質の発現の存在またはレベルの変化を決定するステップ；および

(c) 前記マーカータンパク質の発現の存在またはレベルの変化に基づいて前記試験化合物の感作ポテンシャルを決定する（ここで、前記1以上のマーカータンパク質の発現の存在もしくはレベルの変化は前記試験化合物が感作ポテンシャルを有することを示す）ステップ

40

を含むものである前記方法が提供される。

【0020】

発現の存在またはレベルの変化は、細胞または周囲環境中のタンパク質マーカーの量を確立することにより決定してもよい。あるいは、それは前記マーカータンパク質をコードする核酸配列またはそれらの、例えば、mRNAの型の存在または量を検出することにより決定してもよい。コードする核酸またはタンパク質それ自体の存在または増加を間接的に測定してもよい。例えば、核酸を細胞から抽出し増幅した後に定量してもよい。タンパク質を細胞から抽出しかつ濃縮しおよび/または標識した後に決定してもよい。

50

【0021】

表1は102種のタンパク質マーカ－を含有する。本発明の好ましい実施形態において、本方法はこれらのタンパク質マーカ－の複数の発現の存在またはレベルの変化を決定する。従って、本発明の第1の態様による方法は表1に与えたタンパク質マーカ－の2、3、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100種以上の発現の存在またはレベルの変化を決定してもよい。

【0022】

あるいは、本方法は表1に与えたタンパク質マーカ－の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%の発現の存在またはレベルの変化を決定するステップを含んでもよい。

10

【0023】

本発明のこのおよび他の態様による方法は、前記1以上のタンパク質マーカ－の発現のレベルの存在を参照レベルと比較するステップを含んでもよい。本発明の開示を照合すると、当業者は、例えば、同じかまたは同等の細胞株由来の細胞からの値の平均および範囲を誘導することにより、好適な参照レベルを容易に決定することができる。確かな実施形態において、本発明のこのおよび他の態様による方法はさらに、前記1以上のマーカ－タンパク質に対する参照レベルを決定するステップを含んでもよく、試験化合物と接触した細胞で発現される前記1以上のタンパク質マーカ－の参照レベル以上または以下の存在または量はその化合物の感作ポテンシャルを示すと考えることができる。

【0024】

しかし参照レベルは、好ましくは、例えば、入手しうるデータ記録の形態で与えてもよい予め定めたレベルである。

20

【0025】

試験化合物をいずれの細胞と接触させてもよい。好ましくは、細胞は哺乳動物皮膚細胞を代表するもの、例えば、初代ケラチノサイトまたはケラチノサイト由来の細胞株であってもよい。さらに好ましくは、細胞を初代細胞、例えば、表皮ケラチノサイト、バルジ由来のケラチノサイトまたは包皮ケラチノサイトから得る。他の実施形態において、細胞はケラチノサイトの特性を持つヒト細胞由来である。例えば、HaCaT細胞はCLS - Cell Lines Service (Eppenheim, Germany) から購入することができ、NCTC2544はICLC (Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italy) から購入することができる。

30

【0026】

多くの他の細胞株が当業者には公知であろう。

【0027】

本発明のこの態様による方法を用いて、試験化合物を細胞に接触させた時に表1(A)グループ1に与えた1以上のマーカ－タンパク質の存在または発現レベルの変化を決定することにより、試験化合物の接触感作ポテンシャルを決定することができる。1以上のマーカ－タンパク質は表1(A)グループ1から選択される2、4、5、6、8またはそれ以上のものであってもよく；または全12のマーカ－タンパク質を含んでもよい。

【0028】

さらなる実施形態においては、本方法を用いて、試験化合物を細胞に接触させた時に表1(B)グループ2に与えた1以上のマーカ－タンパク質の存在または発現レベルの変化を決定することにより、試験化合物の刺激ポテンシャルを決定することができる。1以上のマーカ－タンパク質は表1(B)グループ2から選択される2つ、3つまたはそれ以上のものであってもよく；または6つ全てのマーカ－タンパク質を含んでもよい。

40

【0029】

表1：化学感作効果のタンパク質マーカ－

(A)グループ1：トップ12の皮膚感作物質マーカ－；(B)グループ2：トップ6の皮膚刺激マーカ－；(C)グループ3：さらなる感作および刺激効果の一般的マーカ－

【表 1】

配列 番号	タンパク質名	IPI 受託番号	遺伝子名	UniProt 受託番号	既知の感作物質または刺激 物質に曝露時の細胞溶解液 タンパク質レベルの変化 (*)
	A グループ 1				
1	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロ ゲナーゼ	IPI00219018	GAPDH	P04406	増加
2	チオレドキシシン	IPI00216298	TXN	P10599	増加
3	LIM ドメインのアイソフォーム β および アクチン-結合タンパク質 1	IPI00008918	LIMA1	Q9UHB6	増加
4	メタロチオネイン-1G のアイソフォーム 1	IPI00008752	MT1G	P13640	増加
5	60S リボソームタンパク質 L31	IPI00026302	RPL31	P62899	増加
6	アネキシシン A3	IPI00024095	ANXA3	P12429	増加
7	真核生物の翻訳開始因子 3 サブユニット C	IPI00016910	EIF3CL;EIF3C	Q99613	増加
8	ρ GDP-解離インヒビター-1	IPI00003815	ARHGDI1A	P52565	減少
9	ポリ (rC)-結合タンパク質 1	IPI00016610	PCBP1	Q15365	増加
10	スクレオソームアセンブリータンパク質 1-様 1	IPI00023860	NAP1L1	P55209	増加
11	熱ショック 70kDa タンパク質 1	IPI00304925	HSPA1B;HSPA1A	P08107	増加
12	アルド-ケトレダクターゼファミリー-1 メンバーC2	IPI00005668	AKR1C2	P52895	増加
	B グループ 2				
13	リボソームタンパク質 L14 変異体	IPI00555744	RPL14	P50914	増加*
14	上皮成長因子受容体キナーゼ基質 8	IPI00290337	EPS8	Q12929	増加*
15	プラスミノーゲンアクチベーターインヒ ビター-2	IPI00007117	SERPINB2	P05120	増加*
16	電位依存性アニオン選択的チャネルタン パク質 3 のアイソフォーム	IPI00031804	VDAC3	Q9Y277	増加*
17	アネキシシン A1	IPI00218918	ANXA1	P04083	増加*
18	シスタチン-B	IPI00021828	CSTB	P04080	増加*
	C グループ 3				
19	クラスリン重鎖 1 のアイソフォーム 1	IPI00024067	CLTC	Q00610	減少
20	伸長因子 1- α 1	IPI00396485	EEF1A1	P68104	減少
21	アネキシシン A2 アイソフォーム 1	IPI00418169	ANXA2	P07355	増加
22	cDNA FLJ54535、ピルビン酸キナーゼア インザイムに高度に類似	IPI00910979	PKM2	B4DUU6	増加
23	α -エノラーゼのアイソフォーム α -エノ ラーゼ	IPI00465248	ENO1	P06733	増加
24	神経芽細胞 分化に関係するタンパク質 AHNAK	IPI00021812	AHNAK	Q09666	増加
25	熱ショック同族 71kDa タンパク質のアイ ソフォーム 1	IPI00003865	HSPA8	P11142	減少
26	ケラチン、I 型細胞骨格 14	IPI00384444	KRT14	P02533	減少
27	ユビキチンおよびリボソームタンパク質 S27a 前駆体	IPI00179330	UBC;UBB;RPS27A	P62979	減少

10

20

30

40

28	FLJ54957、トランスケトラーゼに高度に類似	IPI00643920	TKT	B4DE31	増加
29	ガレクチン-1	IPI00219219	LGALS1	P09382	増加
30	ピルビン酸キナーゼアイソザイム M1/M2 のアイソフォーム M1	IPI00220644	PKM2	E7EUQ8	減少
31	チューブリンβ鎖	IPI00011654	TUBB	Q6P602	減少
32	スクレオホスミンのアイソフォーム 2	IPI00220740	NPM1	P06748	減少
33	ヌクレオシド二リン酸キナーゼ B のアイソフォーム 1	IPI00026260	NME1;NME2	P22392	増加
34	トロンボスポンジン-1	IPI00296099	THBS1	P07996	減少
35	cDNA FLJ55792、L-乳酸デヒドロゲナーゼ A 鎖に高度に類似	IPI00217966	LDHA	P00338	増加
36	ケラチン、II 型細胞骨格 5	IPI00009867	KRT5	P13647	増加
37	HSPA5 タンパク質	IPI00003362	HSPA5	P11021	増加
38	チモシンβ-10	IPI00220827	TMSB10	P63313	減少
39	ラミニンサブユニットγ-2 のアイソフォーム・ロング	IPI00015117	LAMC2	Q2M1N2	増加
40	ケラチン、II 型細胞骨格 1	IPI00220327	KRT1	P04264	減少
41	ADP/ATP ペプチジル 2	IPI00007188	SLC25A5	P05141	減少
42	アクチン、細胞質 1	IPI00021439	ACTB	P60709	増加
43	エピブラキシン 1	IPI00010951	EPPK1	P58107	減少
44	コフィリン-1	IPI00012011	CFL1	P23528	増加
45	ラミニンサブユニットβ-3	IPI00299404	LAMB3	Q13751	増加
46	不均一核のリボ核タンパク質 Q のアイソフォーム 1	IPI00018140	SYNCRIP	O60506	減少
47	ヘモグロビンサブユニットγ-1	IPI00220706	HBG1	E7CYP2	増加
48	グルタチオン S-トランスフェラーゼ P	IPI00219757	GSTP1	P09211	増加
49	フルクトース-二リン酸アルドラーゼ A	IPI00465439	ALDOA	P04075	増加
50	60S リボソームタンパク質 L18	IPI00215719	RPL18	Q07020	減少
51	EEF2 伸長因子 2	IPI00186290	EEF2	P13639	減少
52	RPL4 11kDa タンパク質	IPI00792159	RPL4	P36578	増加
53	RPL6 60S リボソームタンパク質 L6	IPI00329389	RPL6	Q02878	増加
54	ケラチン 7	IPI00847342	KRT7	P08729	増加
55	推定未同定タンパク質 HNRNPA2B1	IPI00386854	HNRNPA2B1	P22626	増加
56	タンパク質 S100-A6	IPI00027463	S100A6	P06703	増加
57	Tudor ドメイン含有タンパク質 6	IPI00030153	TDRD6	O60522	増加
58	コイルドコイルドメイン含有タンパク質 KIAA1407	IPI00477003	KIAA1407	Q8NCU4	減少
59	ヒストン H2B 1 型-L	IPI00018534	HIST1H2BL	Q99880	増加
60	ペプチジル-プロリル cis-trans イソメラーゼ A	IPI00419585	PPIA	A8K220	増加
61	cDNA FLJ53068、アデニルシクラーゼ関連タンパク質 1 と高度に類似	IPI00643567	CAP1	Q01518	減少
62	Tu 翻訳伸長因子、ミトコンドリア前駆体	IPI00027107	TUFM	P49411	減少
63	SH3 ドメイン結合グルタミン酸リッチタンパク質様 3	IPI00010402	SH3BGRL3	Q86Z22	増加
64	コーニフィン-B	IPI00304903	SPRR1B	P22528	減少

10

20

30

40

65	インテグリンβ-4のアイソフォームβ-4C	IPI00027422	ITGB4	P16144	減少
66	60Sリボソームタンパク質L35	IPI00412607	RPL35	P42766	増加
67	60Sリボソームタンパク質L34	IPI00219160	RPL34	P49207	減少
68	タンパク質S100-A8	IPI00007047	S100A8	P05109	減少
69	HSP90B1エンドプラスミン	IPI00027230	HSP90B1	P14625	増加
70	ヘモグロビンサブユニットα	IPI00410714	HBA2;HBA1	P69905	増加
71	14-3-3タンパク質αのSFNアイソフォーム1	IPI00013890	SFN	P31947	増加
72	HSP90AA1熱ショック90kDaタンパク質1、αアイソフォーム1	IPI00382470	HSP90AA1	P07900	増加
73	S100A9タンパク質S100-A9	IPI00027462	S100A9	P06702	減少
74	cDNA FLJ54408、熱ショック70kDaタンパク質1と高度に類似	IPI00911039	HSP70.1	B4E3B6	増加
75	ケラチン、I型細胞骨格17	IPI00450768	KRT17	Q04695	減少
76	熱ショックタンパク質β-1	IPI00025512	HSPB1	P04792	減少
77	FASN脂肪酸シターゼ	IPI00026781	FASN	P49327	減少
78	KRT6Aケラチン、II型細胞骨格6A	IPI00300725	KRT6A	P02538	減少
79	デスマブラキンのDSPアイソフォームDPI	IPI00013933	DSP	P15924	減少
80	PRDX1、ペルオキシレドキシシン-1	IPI00000874	PRDX1	Q06830	増加
81	タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ	IPI00010796	P4HB	P07237	増加
82	ヒストンH1.4	IPI00217467	HIST1H1E	P10412	減少
83	60Sリボソームタンパク質L12のアイソフォーム1	IPI00024933	RPL12	P30050	減少
84	チューブリンα-4A鎖	IPI00007750	TUBA4A	P68366	減少
85	チューブリンβ-3鎖	IPI00013683	TUBB3	Q13509	減少
86	14-3-3タンパク質γ	IPI00220642	YWHAQ	P61981	増加
87	ビメンチン	IPI00418471	VIM	P08670	増加
88	フィラミン-A	IPI00302592	FLNA	P21333	増加
89	アネキシンA5	IPI00329801	ANXA5	P08758	増加
90	40Sリボソームタンパク質S28	IPI00719622	RPS28	P62857	減少
91	60S酸性リボソームタンパク質P0	IPI00008530	RPLP0	P05388	増加
92	ラミニンα-3鎖変異体1	IPI00377045	LAMA3	B0YJ32	増加
93	ヒストンH2A型1-H	IPI00081836	HIST1H2AH	Q96KK5	減少
94	真核生物開始因子4A-I	IPI00025491	EIF4A1	P60842	増加
95	モエシン	IPI00219365	MSN	P26038	増加
96	ケラチン、I型細胞骨格16	IPI00217963	KRT16	P08779	減少
97	ホスホグリセリン酸ムターゼ	IPI00453476	PGAM1	P18669	増加
98	タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼA3	IPI00025252	PDIA3	P30101	増加
99	ペプチジル-プロリル-cis-transイソメラーゼB	IPI00646304	PPIB	P23284	増加
100	ガレクチン-7	IPI00219221	LGALS7;LGALS7B	P47929	減少
101	cDNA FLJ45706 fis、クローン FEBRA2028457、ヌクレオリンと高度に類似	IPI00444262	NCL	E7EX81	減少
102	ペルオキシレドキシシン-2	IPI00027350	PRDX2	P32119	増加

10

20

30

40

【0030】

本発明のこの第1の態様および他の態様において、1以上のマーカータンパク質の発現レベルの存在または変化の決定は当業者の十分に能力内の多くの手段で達成することができる。

50

【0031】

前記決定は、核酸またはタンパク質レベルの直接決定に関わってもよく、または、例えば、存在するマーカータンパク質の量と相関のある測定値を与える試験法を用いてもよい。従って、1以上のマーカータンパク質の存在または発現のレベルの決定は

(a)その細胞を前記マーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸配列と選択的に結合する少なくとも1つの特異的結合メンバーと接触させるステップ；および

(b)前記特異的結合メンバーとマーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸配列により形成される複合体を検出しおよび/または決定するステップを含む。

10

【0032】

特異的結合メンバーはマーカータンパク質と特異的かつ選択的に結合する抗体または抗体フラグメントであってもよい。前記決定は、1以上のマーカータンパク質の既知の発現レベルの標準を用いて標準曲線を準備するステップおよび試験化合物と接触させた細胞を用いて得た読取値を比較して1以上のマーカータンパク質の発現のレベルの変化の測定値を得るステップを含むものである。

【0033】

色々な方法が1以上のマーカータンパク質の存在または発現のレベルの変化を決定するために好適でありうる：限定されるものでないが、これらの例としては、ウェスタンブロット、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、競合EIA（競合酵素イムノアッセイ）、DAS-ELISA（二重抗体サンドイッチ-ELISA）、液体イムノアレイ技法）、免疫細胞化学または免疫組織化学技法、特異的抗体を含むタンパク質マイクロアレイの使用に基づく技法、「ディップスティック」アッセイ、アフィニティクロマトグラフィ技法および液体結合アッセイが挙げられる。特異的結合メンバーはタンパク質マーカーまたはその部分と選択的に結合する抗体または抗体フラグメントであってもよい。いずれの好適な抗体フォーマットを使用してもよい。

20

【0034】

本発明のいずれかの態様による本発明で意図する特異的結合メンバーのさらなるクラスは、アプタマー（核酸アプタマーおよびペプチドアプタマーを含む）を含むものである。有利な方法として、タンパク質マーカーを指向するアプタマーを米国特許5,475,096および5,270,163に記載のSELEX（Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment）として知られる技法により与えることができる。

30

【0035】

本発明のこのおよび他の態様において、1以上のマーカータンパク質の存在または発現のレベルの決定は質量分析により実施することができる。表1から選択されるタンパク質マーカーのレベルを測定するのに好適な技法は当業者が容易に利用できるものであって、選択反応モニタリング（SRM）および多重反応モニタリング（MRM）、同位体希釈質量分析に関する技法を含み、SILAC、AQUA（WO 03/016861に開示され、その全内容は具体的に本明細書に参照により組み込まれる）およびTMTキャブリエーター（WO 2008/110581に開示され；その全内容は具体的に本明細書に参照により組み込まれる）が含まれる。

40

【0036】

WO 2008/110581は、同重体質量タグを用いて参照サンプル中の全てのタンパク質の別々のアリコートに標識し、前記サンプルの標識後に、定量的な比率で混合して標準校正曲線を発行する方法を開示している。次いで試験サンプルを同じセットの同重体質量タグのさらなる独立メンバーで標識し、そして標準校正曲線で混合する。この混合物をタンデム質量分析で処理し、MS/MSスペクトルの同重体質量タグから遊離される一意的な質量を報じるイオンの出現に基づいて特定のタンパク質から誘導されたペプチドを同定しかつ定量することができる。

【0037】

参照レベルとして、既知または予測タンパク質マーカー由来のペプチドを、前記タンバ

50

ク質マーカーのトリプシン、ArgC、AspNまたはLys-C消化により作製することができる。いくつかの事例において、質量分析に基づくタンパク質マーカーの決定を使う場合、本発明の方法は、タンパク質マーカーおよび/または少なくとも1つのタンパク質マーカー由来のペプチドを含む少なくとも2つの異なるアリコートを含む較正サンプルを提供し、それぞれのアリコートは既知の量であり、そして前記生体サンプルとそれぞれの前記アリコートは1以上の同重体質量標識で区別して標識される。好ましくは、同重体質量標識はそれぞれ異なる質量分析的に明確な質量マーカーグループを含むものである。

【0038】

従って、本発明の好ましい実施形態において、本方法は、既知タンパク質マーカー由来のペプチドの1以上の遷移の決定を用いる選択反応モニタリングにより、試験化合物と接触させた細胞中の表1から選択されるマーカータンパク質の存在または発現レベルを決定するステップ；試験下の細胞中のペプチドレベルを、先に細胞による接触感受性を表すと決定したペプチドレベルと比較するステップ；ならびに前記1以上のマーカータンパク質の発現の変化に基づいて試験化合物の感受性ポテンシャルを決定するステップを含むものである。比較ステップは既知量の対応する合成ペプチドで処理した細胞から得たマーカータンパク質由来のペプチドの量を決定するステップを含んでもよい。合成ペプチドは、細胞から得られるペプチドと配列は同一であるが、標識、例えば異なる質量または重同位体のタグにより識別することができる。

10

【0039】

いくつかの実施形態において、マーカー由来のペプチドは表5から選択される。これらの実施形態において、本方法は1以上（または複数、例えば、2、3、4、5、8、10、15、20、30、40もしくは全て）の表5中の遷移の決定を用いる選択反応モニタリングにより、試験化合物に接触させた細胞中のマーカータンパク質の1以上のレベルの存在または発現を決定するステップ；試験している細胞中のペプチドレベルを予め細胞により接触感受性を表すことが確認されたペプチドレベルと比較するステップ；および前記1以上のマーカータンパク質の発現の変化に基づいて試験化合物の感作ポテンシャルを決定するステップを含むものであってもよい。比較ステップは、既知量の対応する合成ペプチドで処理した細胞からのマーカータンパク質由来のペプチドの量を決定するステップを含んでもよい。合成ペプチドは細胞から得たペプチドと配列が同一であるが、標識、例えば、異なる質量または重同位体のタグにより識別することができる。

20

30

【0040】

好ましい実施形態において、1以上の決定する遷移には、次表：

分析物	ペプチド配列	TMT 標識	m/z (Q1)	m/z (Q3)	フラグメント イオンの 型	衝突 エネルギー	スタート 時間	ストップ 時間
HSPA8	GTLDPVEK	軽	653.8 80455	611.335 88	b4	29	9.5	11.6
HSPA8	GTLDPVEK	軽	653.8 80455	696.425 03	y4	30	9.5	11.6
HSPA8	GTLDPVEK	軽	653.8 80455	811.451 973	y5	31	9.5	11.6
HSPA8	TVTNAVVTVPAY FNDSQR	軽	736.0 53596	640.362 429	b4	47	11.2	12.9
HSPA8	TVTNAVVTVPAY FNDSQR	軽	736.0 53596	711.399 543	b5	36	11.2	12.9
HSPA8	TVTNAVVTVPAY FNDSQR	軽	736.0 53596	810.467 957	b6	32	11.2	12.9
S100A 8	ALNSIIDVYHK	軽	574.3 35375	610.351 865	b4	31	11.4	12.9
S100A 8	ALNSIIDVYHK	軽	574.3 35375	723.435 929	b5	27	11.4	12.9
S100A 9	LGHPDTLNQGEF K	軽	635.3 4471	704.393 73	y4	25	10	11.6
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	軽	752.4 16646	682.372 994	b4	42	12.4	14.2
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	軽	752.4 16646	720.425 03	y4	35	12.4	14.2
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	軽	752.4 16646	795.457 058	b5	38	12.4	14.2
TYB10	ETIEQEK	軽	662.8 67545	628.362 429	y3	34	8.4	10.5
TYB10	ETIEQEK	軽	662.8 67545	697.372 66	b4	37	8.4	10.5
TYB10	ETIEQEK	軽	662.8 67545	757.405 023	y4	34	8.4	10.5

【 0 0 4 1 】

に掲げたものの1以上（または複数、例えば、3、4、5、8、10、12、または15全て）が含まれる。

【 0 0 4 2 】

1以上のこれらの合成タンパク質マーカー由来の標識したまたは無標識のペプチドは本発明のさらなる態様である。これらの合成ペプチドは、試験化合物の感作ポテンシャルを決定するキットの形で提供することができる。この態様において、合成ペプチドは表5から選択されるペプチドの配列を含むかまたはそれらから成るものであってもよい。

【 0 0 4 3 】

タンパク質マーカー発現のレベルを決定する他の好適な方法には、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間（SELDI-TOF）質量分析；マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間（MALDI-TOF）質量分析；エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析；ならびに好ましいSRMが含まれる。

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態において、1以上のタンパク質マーカーの存在または量の決定は試

10

20

30

40

50

験下の細胞由来のmRNAの存在または量を測定するステップを含む。試験化合物に接触させた細胞中のタンパク質マーカーをコードするmRNAの存在またはレベルによって、試験化合物が感作ポテンシャルを有するかどうかを決定することができる。当業者はmRNAをコードするタンパク質マーカーのレベルを測定するのに好適な技法を容易に利用することができる。これには「リアルタイム」逆転写酵素PCRまたはノーザンブロットが含まれる。mRNAをコードするタンパク質マーカーのレベルを測定する方法は、タンパク質マーカーの配列をコードする遺伝子またはその相補体に向けられた少なくとも1つのプライマーまたはプローブの使用を含みうる。前記少なくとも1つのプライマーまたはプローブは表1および図10に記載のタンパク質マーカーをコードするヌクレオチド配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、98%、99%または100%同一性を有する少なくとも10、15、20、25、30または50隣接ヌクレオチド配列のヌクレオチド配列を含むものであってもよい。

10

【0045】

好ましくは、少なくとも1つのプローブまたはプライマーはストリンジントな条件下でタンパク質マーカーをコードする核酸配列とハイブリダイズする。

【0046】

本発明の方法は細胞を結合メンバーと上記のように接触させるステップを含むが、また細胞により分泌された産物を含有する細胞周囲の培地と接触させるステップを含んでもよい。さらに、細胞を溶解した後に結合メンバーと接触させて1以上のマーカータンパク質との接触を直接または間接に増加することが好ましいであろう。

【0047】

20

結合メンバーを固体支持体上に固定してもよい。これは抗体アレイまたは核酸マイクロアレイの形であってもよい。このようなアレイは当技術分野では周知である。固体支持体を細胞周囲の細胞溶解液または培地と接触させて、それにより結合メンバーが1以上のマーカータンパク質の存在もしくは量を表す細胞産物または分泌された産物と結合できるようにしてもよい。

【0048】

いくつかの実施形態において、結合メンバーはマーカータンパク質またはその一部分と結合できる抗体またはそのフラグメントである。他の実施形態において、結合メンバーは検出すべき核酸の配列と結合できる（すなわち、相補性の）核酸分子であってもよい。

【0049】

30

本方法はさらに固体支持体を、その占有結合部位、非占有結合部位または1以上のマーカータンパク質、抗体または核酸と結合できる現像剤と接触させるステップを含むものであってもよい。

【0050】

現像剤は標識を含んでもよくそして本方法は標識を検出して、細胞、細胞培地または細胞溶解液中の1以上のマーカータンパク質、抗体または核酸の存在または量を表す値を得るステップを含んでもよい。

【0051】

標識は、例えば、放射性標識、蛍光色素分子、リン光体、レーザー染料、色素生産性染料、高分子コロイド粒子、着色ラテックスビーズ、磁性または常磁性体、検出可能な結果を生じる反応を触媒する酵素であってもよく、または標識はタグである。

40

【0052】

本方法は単一サンプル中の複数のマーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸の発現の存在またはレベルを決定するステップを含みうる。例えば、表1、表1(A)グループ1、表1(B)グループ2、表1(C)グループ3またはそれらの組み合わせから選択される複数の結合メンバーを固体支持体上の予め規定した位置に固定してもよい。固体支持体上の表1から選択される結合メンバーの数は支持体上の結合メンバーの総数の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% または 100% であってもよい。

【0053】

あるいは、複数の質量特性を上記の質量分析技法に対して選択する。

50

【0054】

結合メンバーはマーカートンパク質またはその一部分に特異的な抗体であってもよく、またはマーカートンパク質の発現の存在、増加または減少を表す核酸分子、例えばmRNA配列と結合する核酸分子であってもよい。

【0055】

特異的なマーカートンパク質に対する抗体はマーカートンパク質のいずれかの生物学的に関係のある状態に対する抗体であってもよい。従って、例えば、前記抗体は体内ではグリコシル型で存在するタンパク質の非グリコシル型に対して、タンパク質の前駆体型、もしくは前駆体タンパク質のより成熟した型、例えばそのシグナル配列を差し引いたものに対して、または、マーカートンパク質の関係するエピトープを運ぶペプチドに対するものであってもよい。

10

【0056】

本発明の第2の態様において、試験化合物の感作ポテンシャルをin vitroで決定するために使用するキットを提供する。本キットは利用者が試験下の細胞中の、表1に与えられた1以上のマーカートンパク質またはその断片、前記マーカートンパク質に対する1以上の抗体、および前記マーカートンパク質またはその断片をコードする核酸分子から選択される分析物の存在または発現のレベルを決定することを可能にするものであって、このキットは

- (a)分析物と結合することができる結合メンバーがその上に固定された固体支持体；
- (b)標識を含む現像剤；および、任意に
- (c)洗浄溶液、希釈剤およびバッファーから成る群より選択される1以上の化合物を含むものである。

20

【0057】

結合メンバーは上記の通りでありうる。特に、マーカートンパク質またはその断片を検出するための結合メンバーは、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(C)グループ3またはそれらの組み合わせから選択される1以上のマーカートンパク質と結合できる抗体であってもよい。

【0058】

一実施形態において、キットは分析物をアッセイに適合しうるフォーマットで提供しうる。上記の通り、サンプル中のタンパク質、抗体または核酸分子の存在または量を決定するための様々なアッセイは当技術分野で公知である。様々な好適なアッセイを以下にさらに詳しく記載するが、それぞれが本発明の実施形態を形成する。

30

【0059】

本キットは試験化合物の感作ポテンシャルを決定するin vitroの方法に用いることができる。この方法は複数サンプルの全体的なスクリーニングの一部として実施してもよいし、または個体から得た単一サンプルで実施してもよい。

【0060】

キットはさらに定量的な測定値を与える標準または参照を提供することができ、それにより1以上のマーカートンパク質の発現レベルの決定を比較することができる。この標準は前記化合物に対する接触感受性を示すマーカートンパク質表現のレベルを示しうる。

40

【0061】

キットはまた、本方法を実施するための印刷した取扱説明書を含んでもよい。

【0062】

一実施形態において、試験化合物の感作ポテンシャルを決定するキットは、表1に与えたマーカートンパク質の1以上と結合できる1以上の抗体調製物の1セット、前記抗体を前記試験化合物に曝した細胞または前記細胞から得た抽出物と共にインキュベートする手段、および前記タンパク質の前記抗体との結合を定量的に検出する手段を含有するものである。キットはまた、さらなる試薬およびバッファーおよび本方法を実施する方法を詳述した印刷した取扱説明書および、任意に、定量的な結果を前記化合物に対する接触感受性を示すものとして解釈する方法を含有してもよい。

50

【0063】

さらなる実施形態において、キットは質量分析アッセイを実施するものであってもよく、参照ペプチド（例えばSRMペプチド）のセットを適合しうるフォーマットで含んでもよく、ここでセット中の各ペプチドは表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3に記載の1以上のマーカートンパク質のそれぞれまたはそれらの組み合わせを一意的に表すものである。好ましくは2つそしてより好ましくは3つのかかる一意的なペプチドがキットを設計した各タンパク質に対して用いられ、ここで、一意的なペプチドの各セットは、既知の感作化合物に曝された前記細胞の標準調製物中のかかるタンパク質レベルを反映する既知の量だけ与えられる。任意に、キットはまた、前記細胞からタンパク質を単離および抽出するためのプロトコルおよび試薬、トリプシンなどのタンパク質分解酵素の精製調製物ならびにモニターすべき前駆体質量および特異的な遷移の詳細を含む方法の詳しいプロトコルを与えてもよい。任意に、本発明のキットはまた、適当な細胞、容器、増殖培地およびバッファーを含んでもよい。

10

【0064】

本発明の第三の態様においては、前記アレルギーまたは刺激物質に曝された個人に対するアレルギーまたは刺激物質による接触感作を診断または予後モニタリングする方法であって、(a)前記個人から得た生体サンプル中の表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3から選択される1以上のタンパク質マーカまたは前記タンパク質マーカもしくはその一部分のいずれか1つをコードする核酸の存在または発現のレベルを決定するステップを含むものである前記方法が提供される。

20

【0065】

生体サンプルは好ましくは、個人からの細胞、例えば、皮膚細胞を含むサンプルである。細胞を溶解しそして細胞溶解液について決定ステップを行ってもよい。決定ステップは本発明の第1の態様に記載の通り実施することができる。

【0066】

前記方法は、アレルギーまたは刺激物質との接触を時点ゼロとする時間軸の期間全体にわたり採取した複数の生体サンプル中の1以上のタンパク質マーカの存在または発現のレベルを決定するステップを含んでもよい。

【0067】

本発明の第三の態様による方法を行うキットも提供される。

30

【0068】

前記キットは

(a)1以上の結合メンバーがその上に固定された固体支持体であって、ここで各結合メンバーは表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(C)グループ3に与えられたグループから選択されるタンパク質マーカまたは前記タンパク質マーカもしくはその断片をコードする核酸と選択的に結合する前記固体支持体；

(b)標識を含む現像剤；および

(c)洗浄溶液、希釈剤およびバッファーから選択される1以上の成分を含んでもよい。

【0069】

キットはまた、その方法を実施するための印刷された取扱説明書を含んでもよい。

40

【0070】

キットはさらに、定量的な基準を提供する標準または参照を含んでもよく、それにより1以上のマーカートンパク質の発現レベルの決定を比較することができる。標準は前記化合物に対する接触感受性を示すマーカートンパク質発現のレベルを示してもよい。

【0071】

同様に、アレルギーまたは刺激物質に曝しておいた個人から採取した組織サンプル中の表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(C)グループ3から選択される1以上のタンパク質の発現レベルを測定し、そのレベルをアレルギーまたは刺激物質に曝さなかった細胞からのレベルと比較してもよく：ここで、表1に記載の変化と一致するタンパク質発現レベルの変化はアレルギーの誘発であると診断する。

50

【 0 0 7 2 】

特定のタンパク質の発現レベルが化学感作物質、例えばアレルゲンまたは刺激物質への曝露後に改変される場合、前記タンパク質の決定は、初めて、接触皮膚炎などの化学誘発性アレルギー症状を診断および治療するための新しい標的を提供する。

【 0 0 7 3 】

従って、本発明の第四の態様においては、化学感作物質、例えばアレルゲンまたは刺激物質に対する個人の診断または予後モニタリングのための、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(C)グループ3から選択される1以上のタンパク質マーカーの使用が提供される。

【 0 0 7 4 】

例えば、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3からの複数のタンパク質マーカーを、アレルギーまたは刺激を患う患者における皮膚アレルギーまたは刺激に対する治療の有効性をモニタリングする方法に用いることができる。その方法は、前記個人から治療前に得た組織サンプルと治療後または治療中に採取した1以上のさらなるサンプルとにおける前記タンパク質マーカーの存在または発現のレベルの変化を決定するステップ（例えば、本発明の第1の態様により）を含むものであってもよく、ここで複数のタンパク質マーカーの正常な発現レベルへの回復が治療の成功を示す。

【 0 0 7 5 】

本発明のこの態様のある実施形態においては、治療を表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3から選択される複数のタンパク質マーカーの1以上を標的化するように特に設計してもよい。従って、本発明は表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3；またはそれらの一部分に与えた1以上のタンパク質マーカーの皮膚アレルギーを治療するための標的としての使用の提供に拡張される。

【 0 0 7 6 】

本発明の全ての態様において、本方法はほとんどの場合、in vitroの方法で初代細胞培養、確立された細胞株、または接触アレルギー、例えば、ACD、刺激を患う患者から採取した生検サンプル由来のサンプルについて行われる。本明細書に記載の方法に用いるサンプルは、全細胞溶解液、細胞成分画分、例えば細胞質、核、ミトコンドリア、細胞膜、細胞培地上清、組織または体液サンプル、例えば皮膚組織サンプル、気管支肺胞洗浄（BAL）液、血液または血液産物（例えば、血清または血漿）サンプルまたは尿サンプルであってもよい。

【 0 0 7 7 】

本発明の全ての態様においておよび全ての実施形態において、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3から選択される1以上のマーカーは次の条件、すなわち、前記マーカーが熱ショック同族71kDaタンパク質のアイソフォーム；タンパク質S100-A8；タンパク質S100-A9；ADP/ATPトランスロカーゼ2；ペプチジル-プロリルcis-transイソメラーゼA；ヒストンH2Btype1-L；チュープリン-4A鎖；タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ；Tu翻訳伸長因子、ミトコンドリア前駆体；ビメンチン；SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチタンパク質様3；タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼA3；アネキシンA5；フィラミン-Aのアイソフォーム2；ガレクチン-1；チオレドキシニン；ペルオキシレドキシニン；熱ショックタンパク質90kDa（細胞質）、クラスAメンバー1アイソフォーム1；伸長因子2；フルクトース二リン酸アルドラーゼA；グリセルアルデヒド-3リン酸デヒドロゲナーゼ；伸長因子1-；cDNA FLJ45706 fis、クローンFEBRA2028457、ヌクレオリンと高度に類似；およびヌクレオホスミンのアイソフォーム2の1以上または組み合わせでないという条件が付くものであってもよい。

【 0 0 7 8 】

ここで本発明の実施形態を、例を用いてかつ、限定されるものでないが、次の添付図を参照して記載する。本明細書に記載の全ての文書は本明細書に参照により組み込まれる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 9 】

10

20

30

40

50

【図1】ヒト初代ケラチノサイトで見出されたANOVAフィルターしたバイオマーカーのPLS負荷プロットであり、ここで $2X[1] = 0,210301$ 、 $R2X[21] = 0,224212$ である。

【図2】PLSスコアプロットは、表1に掲げたバイオマーカーを用いると感作物質と刺激物質に曝したサンプル間の分離が良いことを示す。

【図3】ケラチノサイト中の熱ショック70kDaタンパク質1 (HSPA1A ; HSPA1B) のELISA定量。

【図4】ケラチノサイト細胞抽出物中のアルド-ケトレダクターゼC1 (AKRC1) のウェスタンブロット定量。

【図5】ケラチノサイト細胞抽出物中のメタロチオネイン1G (MT1G) のウェスタンブロット定量。

【図6 A】102種のタンパク質バイオマーカーのLog2変換して参照した倍数変化。菱型：アレルギー；円：刺激物質；矩形：対照。

【図6 B】102種のタンパク質バイオマーカーのLog2変換して参照した倍数変化。菱型：アレルギー；円：刺激物質；矩形：対照。

【図6 C】102種のタンパク質バイオマーカーのLog2変換して参照した倍数変化。菱型：アレルギー；円：刺激物質；矩形：対照。

【図6 D】102種のタンパク質バイオマーカーのLog2変換して参照した倍数変化。菱型：アレルギー；円：刺激物質；矩形：対照。

【図7 A】試験化学物質間における、102種のタンパク質バイオマーカーの相対的存在量の相違。対照：菱型；ニッケル：クロス記号；TMTD：プラス記号；CA：星印；SDS：逆三角；DNBS：正方形；DNCB：円；SA：三角。

【図7 B】試験化学物質間における、102種のタンパク質バイオマーカーの相対的存在量の相違。対照：菱型；ニッケル：クロス記号；TMTD：プラス記号；CA：星印；SDS：逆三角；DNBS：正方形；DNCB：円；SA：三角。

【図7 C】試験化学物質間における、102種のタンパク質バイオマーカーの相対的存在量の相違。対照：菱型；ニッケル：クロス記号；TMTD：プラス記号；CA：星印；SDS：逆三角；DNBS：正方形；DNCB：円；SA：三角。

【図7 D】試験化学物質間における、102種のタンパク質バイオマーカーの相対的存在量の相違。対照：菱型；ニッケル：クロス記号；TMTD：プラス記号；CA：星印；SDS：逆三角；DNBS：正方形；DNCB：円；SA：三角。

【図8 - 1】表4 タンパク質配列表。

【図8 - 2】(図8 - 1の続き)

【図8 - 3】(図8 - 2の続き)

【図8 - 4】(図8 - 3の続き)

【図8 - 5】(図8 - 4の続き)

【図8 - 6】(図8 - 5の続き)

【図8 - 7】(図8 - 6の続き)

【図8 - 8】(図8 - 7の続き)

【図8 - 9】(図8 - 8の続き)

【図8 - 10】(図8 - 9の続き)

【図8 - 11】(図8 - 10の続き)

【図8 - 12】(図8 - 11の続き)

【図8 - 13】(図8 - 12の続き)

【図8 - 14】(図8 - 13の続き)

【図8 - 15】(図8 - 14の続き)

【図8 - 16】(図8 - 15の続き)

【図8 - 17】(図8 - 16の続き)

【図8 - 18】(図8 - 17の続き)

【図8 - 19】(図8 - 18の続き)

【図8 - 20】(図8 - 19の続き)

10

20

30

40

50

【図8 - 21】(図8 - 20の続き)

【図8 - 22】(図8 - 21の続き)

【図8 - 23】(図8 - 22の続き)

【図8 - 24】(図8 - 23の続き)

【図9 - 1】表5 ペプチド、遷移質量およびSRMアッセイに用いたTSQ Vantage (Thermo Scientific)用の質量分析設定。

【図9 - 2】(図9 - 1の続き)

【発明を実施するための形態】

【0080】

定義

10

用語「抗体」にはポリクローナル抗血清、モノクローナル抗体、抗体のフラグメント、例えば1本鎖およびFabフラグメント、ならびに遺伝子操作で作られた抗体が含まれる。抗体はキメラまたは単一種のものであってもよい。

【0081】

用語「マーカータンパク質」または「バイオマーカー」には、翻訳後修飾を含む、同定されたタンパク質の全ての生物学的に関連する形態が含まれる。例えば、マーカータンパク質はグリコシル化された、リン酸化された多量体または前駆体の形態で存在してもよい。

【0082】

用語「対照」は、試験細胞と同等であるが試験化合物を欠くバッファーとインキュベートしておいた培養細胞株、ヒトまたは動物被験体から採取した細胞の初代培養、またはヒトまたは動物被験体から採取した生検材料を意味する。

20

【0083】

表現「対照サンプルと比較した濃度の増加/減少」は、比較のステップを実際に行うことを意味しない、何故なら、当業者にはその濃度が異常に高いかまたは低いことが明らかでありうるからである。代わりに、以前に決定した非感作性化学物質への曝露後の正常なレベルを参照値として用いてもよい。

【0084】

用語「抗体アレイ」または「抗体マイクロアレイ」は一意的な位置指定が可能な固体表面上のエレメントを意味し、それにより、それぞれの一意的な位置指定可能なエレメントに、抗原に対して規定された特異性をもつ抗体が固定され、その後の標的抗原の捕獲およびその後のかかる結合の程度の検出が可能になる。それぞれの一意的な位置指定可能なエレメントは固体表面上の全ての他の一意的な位置指定可能なエレメントから間隔がおかれていて、その結果、特異的な抗原の結合と検出はいずれの隣接するかかる一意的な位置指定可能エレメントとも干渉することがない。

30

用語「ビーズ懸濁液アレイ」は、それぞれの粒子がそのサイズおよび色または蛍光サインに関係するコード特性を含有し、1以上の同定可能な異なる粒子の水性懸濁液を意味し、そしてこのかかるコード特性の特別な組み合わせのビーズの全てが抗原に対して規定した特異性を持つ抗体でコートされ、その後の標的抗原の捕獲およびその後のかかる結合の程度の検出が可能になる。かかるアレイの例は、www.luminexcorp.comに見出すことができ、ここにはLuminex(登録商標)100TM系のxMAP(登録商標)ビーズ懸濁液の応用が記載されている。

40

【0085】

用語「選択反応モニタリング」、「SRM」および「MRM」は、既知のバイオマーカーを表す既知の質量-対-電荷比の前駆体イオンを、イオントラップのタンデム質量分析またはトリプル四極質量分析計による分析用に選好的に標的化した質量分析アッセイを意味する。分析中に、親イオンはフラグメント化され、第2の予め規定した質量-対-電荷比の娘イオンが計数される。典型的には、予め規定した数の安定な同位体置換を有するがその他は標的イオンと化学的に同一である同等の前駆体イオンがこの方法には含まれ、これが定量的な内部標準として作用する。かかる方法の例は、<http://en.wikipedia.org/wiki/Select>

50

ed_reaction_monitoringに見出すことができる。

【0086】

用語「感作物質」は、その化学物質への反復曝露の後に、曝されたヒトまたは動物にアレルギー反応を誘発する化学物質を意味する。

【0087】

「皮膚感作」は、感受性の個人が誘発性の化学アレルギーに局所的に曝されたときに誘発される免疫学的プロセスを意味する。

【0088】

「感作ポテンシャル」は局所曝露を介して皮膚の損傷を引き起こす化合物または元素のポテンシャルを意味する。本発明の目的には、化合物の感作ポテンシャルはアレルギー反応（感作物質）および/または炎症（刺激物質）を介して損傷を引き起こすポテンシャルが含まれる。

【0089】

「刺激物質」は接触部位において化学作用により生体組織に炎症効果を引き起こす化学物質を意味する。皮膚感作に対するバイオマーカーを開発する場合、刺激性化学物質を含めることは重要である、何故なら感作物質（すなわち、DNCB）も刺激を与えうるからである。

【0090】

感作を誘発しない化学物質は「非感作物質」と呼ぶが、刺激物質も含みうる。

【0091】

詳細な説明

化学物質安全性試験の必要性は、医薬品に対してならびに化粧品およびヒトの皮膚および粘膜と接触する広範囲の他製品の販売認可に対して長期にわたり規制プロセスを確立してきた。いくつもの試験体制が確立されていると共に、いくつかの事例ではこれらの試験のごく少数が国家規制機関による目的によって禁止されている。概してこれらの試験は全生存生物研究、典型的にはげっ歯類に基づくものである。

【0092】

今や医薬品および化学物質安全試験に用いる動物数を減らす強い倫理的かつ経済的な動向、ならびに、禁止された試験法に置換わる好適な *in vitro* 試験を同時に見出す必要性が存在する。この状況のもとで本発明者らは、培養細胞株または組織生検内の発現レベルがアレルギーまたは刺激物質化合物に反応して予測しうる方式で変化する一式のタンパク質を提示することについて述べる。

【0093】

かかるタンパク質のセットを発見するために、本発明者らは特許のプロテオーム発見作業手順を *in vitro* 培養したヒト初代ケラチノサイトに適用した。概略を述べると、ケラチノサイトを公知のアレルギー接触感作物質、非アレルギー刺激物質の存在のもとで培養するかまたは無処理のままに置いた。ケラチノサイトを低および高用量の化学物質に曝して用量の効果を探った。曝露した後、ケラチノサイトを収穫して溶解し、タンパク質を抽出した。抽出後、総細胞溶解液をトリプシンを用いてタンパク質の分解処理をして、得られるペプチドをシクプレックス (sixplex) セットの同重体質量タグの1つで標識した (Tandem Mass Tags (登録商標)、Proteome Sciences plc)。

【0094】

タンデム質量タグは、混合前に6種までの異なるサンプルを区別しうる標識付けと1回の質量分析試験での全6サンプルの分析を可能にするように設計した。セット中の各タグは同じ総質量（同重）であるが、質量分析計においてフラグメント化すると一意的なレポーター遺伝子を放出し、他のレポーターイオンと比較したその強度はサンプル中のタンパク質の存在に正比例する。本発明者らの発見実験において4245種のペプチドに対する相対的に定量的な情報を得ることができ、これらのペプチドは時間および費用効果的なやり方の全ての質量分析測定値の少なくとも50%で一致して測定された1980種の一意的なタンパク質を表すものであった。サンプルを初期混合することにより、タンデム質量タグの使用は

10

20

30

40

50

データの堅牢性を増加し、発見方法より高い処理能力によるその後の標的化スクリーニング試験における日常測定に対する最良候補の選択を可能にする。しかし、その発現が化学曝露により改変されることが予想されるこれらのタンパク質を同定するには、監視型および非監視型クラスター解析などの一式の統計解析を行う必要がある。かかる一連の統計手段の選択的応用を介して、本発明者らは一式のトレーニング化学物質への曝露に対する応答で有意に制御される102種のタンパク質マーカーを同定した。これらの102種のタンパク質の中には、接触ならびに非感作性刺激物質のマーカーが存在する。

【0095】

一式のトレーニング化学物質を用いる候補バイオマーカーの同定の後に、本発明者らは分類モデルを開発したが、このモデルは化合物が感作物質/アレルゲンまたは非感作性刺激物質であるかどうかを、表1に掲げた102種のバイオマーカーの1以上の検出量に基づいて予測することができた。この分類モデルを用いると未知の化学物質または化学物質の組み合わせに曝したケラチノサイトからのタンパク質発現データを解釈しかつ前記化学物質をアレルゲンまたは刺激物質のグループに割当てることができる。この試験系はそれ故に化学物質安全性のための生存全生物試験に置換えるのに好適である。

10

【0096】

この研究で用いた発見方法は、動物試験および係属中のEU立法に置換わる倫理的必要性に適合するために必要とされる、未知の安全プロファイルをもつ100、1,000または10,000種の化学物質の日常分析に十分適合していると言えないことは認められる。この潜在的な隘路を克服するためには、表1に掲げた102種のタンパク質バイオマーカーの1以上の分析のもっと標的化した手段の提供が必要であろう。1回の分析で102種までの異なるタンパク質の標的化した測定をする好適な方法がいくつか存在する。1つのかかる方法はイムノアッセイであって、この場合、バイオマーカータンパク質に対する特異性をもつ抗体を用いて前記タンパク質を捕獲、検出または捕獲および検出する。イムノアッセイフォーマットには、限定されるものでないが、酵素結合イムノアッセイ(ELISA)、抗体サンドイッチELISA、競合ELISA、免疫PCRおよびウェスタンブロットが含まれる。少数のタンパク質を測定する場合、各タンパク質に対するELISAまたはウェスタンブロットなどの個々の試験を用いることが可能である。あるいは、複数のバイオマーカーを検出しかつ同時に決定する多重試験法、例えば、抗体アレイおよび/またはビーズ懸濁アレイを用いることもできる。

20

30

【0097】

いくつかの事例では、タンパク質発現のレベルを選択的に決定するために抗体を用いることが望ましくないかまたは不可能でありうる。例として挙げられるのは、バイオマーカーが翻訳後に化学曝露の結果として改変され、かかる改変が免疫学的に不活性である場合、またはタンパク質分解活性がタンパク質の分解を生じ、それにより、利用しうる抗体が認識するエピトープを破壊する場合である。かかる状況では非抗体結合剤、例えばアブタマーを用いてもよい。より好ましくは、選択反応モニタリング(SRM)の原理に基づいて定量的質量分析法を開発することができる。

【0098】

SRM法においては、標的マーカータンパク質を表すペプチドを、マーカー発見中に得た実験データに基づいて選択するかまたはin silicoツールを用いて設計する。典型的には、これら2つのアプローチの組み合わせを用いて最良の結果を得る。SRMによる絶対的定量については、分析サンプル中で測定される生来の形とは同位体として異なる外部の同等の「重」ペプチドを提供することが必要である。かかる同位体として異なる参照ペプチドを提供するためのいくつかの異なるアプローチが存在するものの、それらは全て、1以上の安定な重同位体を生産中にペプチドに加えるという共通の特徴を共有する。最も簡単なしばしば「AQUA」と呼ばれるアプローチは1以上の安定な水素、炭素、窒素または酸素の同位体を用いる。典型的には、同位体の組み合わせを用いて1ペプチド当たり6~10ダルトンの総質量差を導入する。かかる重AQUAペプチドのいくつかの商業的供給源が存在する(例えば、Thermo Scientific (www.thermoscientific.com))。AQUAの代替のアプローチ

40

50

は標準合成ペプチドに付着した共有結合標識を介して重同位体を加える方法である。かかる方法は参照ペプチドを生産する速度とコストに利点を有する。しかし、この方法は次いで、それぞれの分析サンプルを標識するために、同位体として異なるが化学的に同等であるタグの使用を必要とする。タグに基づくSRM法に対するいくつかのアプローチが存在し、それにはmTRAQ(登録商標)(ABSciex)およびTMT(登録商標)(Thermo Scientific)が含まれる。複数の参照ペプチドが必要である場合、コンカテマーポリペプチドで全ての所望のペプチドをコードする合成遺伝子を作製することも可能である。これを次いで好適な発現宿主またはin vitro転写系に形質移入し、発現されるポリペプチドを精製した後に切断して個々の参照ポリペプチドを遊離させる。典型的には、これを重アミノ酸を用いて実施して同位体置換を行い、全てのペプチドが分析サンプル中の天然型と比較して「重」であるようにする。かかる方法の一例はQCONCATシステム(Pratt et al. Nature Protocols 1, - 1029 - 1043 (2006))である。

10

【0099】

当業者は理解しうるように、検出方法は特に本発明を限定するものでなく、標的タンパク質を相対的または絶対的に定量する全ての方法が本発明に組込まれる。

【0100】

ヒトケラチノサイトを皮膚ケラチノサイト細胞培養モデルとして用いて、化学感作物質の感作ポテンシャルを決定するためのタンパク質バイオマーカーに基づくin vitroアッセイ系を開発した。その結果として本発明の追加の態様において、これらのタンパク質マーカーを、皮膚アレルギーを患うと疑われる哺乳動物またはヒトのかかるアレルギーを診断するために利用することができる。この文脈においては、好適な組織サンプル、例えば、皮膚または気管支肺胞洗浄液の生検サンプルを採集し、タンパク質を抽出し、そして本発明の方法の1つによって測定する。前記サンプルで検出したレベルを次いでケラチノサイトにおける感作剤への応答に関連する既知レベルと比較する。本発明のさらなる態様は、現在開示したタンパク質が接触皮膚炎および喘息などの化学的に誘発されるアレルギーを治療する代替りの手段を提供することである。

20

【0101】

4種のバイオマーカー候補、すなわち、HSPA8、S100A8、S100A9およびTYMBIOをニッケルに対する特異的皮膚感作試験を開発するために選んだ。特に、3種のタンパク質HSPA8およびS100A9/A8(同義語:カルグラニューリンA/B;カルプロテクチン)はニッケルによって強くかつ有意に改変される一方、TYMBIOは化学物質が皮膚刺激を誘発する特性を有するかを示すバイオマーカーとして使われる。ニッケルはマウスにおけるアレルギー接触皮膚炎の通常の原因であるが、マウスにおけるこのニッケルに対するアッセイの開発は出来ていない(Kimber et al. 2011)。このアッセイの意図する使用はこれらの化学物質のin vitroアッセイにおける刺激ポテンシャルを試験することに併せてニッケル塩の皮膚感作ポテンシャルを決定することにある。

30

【実施例】

【0102】

本発明をさらに以下の実験により説明する。

【0103】

(実施例1) ケラチノサイトモデルのプロテオーム分析
候補バイオマーカーの発見に用いたトレーニング化学物質

40

ヒトケラチノサイト中のバイオマーカーを発見するために一式のトレーニング化学物質を選択した。選択した化学物質は5種の異なる強度の皮膚感作剤、および2種の非感作物質/刺激物質を含んだ(表2)。

【0104】

接触感作物質/アレルギー;

DNCB: 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(DNCB)はカラー写真処理に用いられる有機化合物である。DNCBは極端なアレルギーと考えられる。

【0105】

50

DNBS：2,4-ジニトロベンゼンスルホン酸は黄褐色の粉末でありエーテル可溶性のアミノアルコールのDNP誘導体を調製するために用いられる。DNBSは強力な接触感作物質である。

【0106】

桂皮酸アルデヒド：3-フェニル-2-プロペナル；シンナマル、シナムアルデヒドは強いシナモン臭をもつ油状の黄色液である。この化合物はシナモンオイルの主成分である。シナムアルデヒドの主要な応用先は香料および芳香剤産業である。これはチューイングガム、アイスクリーム、キャンディ、および飲料として用いられる。桂皮酸アルデヒドは穏やかな感作物質と考えられる。

【0107】

TMTD：テトラメチルチウラムジスルフィド、チラム、チウラム、またはSovchem(登録商標)は白色の粉末または顆粒である。TMTDは果実、野菜、穀物を様々な真菌疾患からまたげっ歯類およびウサギから保護するために種子保護剤として使用される。TMTDは穏やかな感作物質である。

【0108】

ニッケル：ニッケルは銀白色の金属であり、合金を作るために混合される。ニッケルはステンレス鋼、硬貨、ピアスまたは宝飾品の製造に使われる。ニッケルは弱い感作物質であるが、接触アレルギーの日常的な経路である。

【0109】

刺激性 / 非感作性化学物質：

SDS：ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) またはラウリル硫酸ナトリウム (SLS) は多くの洗浄および衛生製品に利用されるアニオン界面活性剤である。SDSは皮膚および眼刺激を引き起こす。

【0110】

サリチル酸は2-ヒドロキシベンゼンカルボン酸としても知られる。サリチル酸は痛みと疼痛を和らげかつ熱を下げる能力で知られる。サリチル酸は、ざ瘡、乾癬、たこ（皮膚硬結）、まめ（皮膚硬結）、毛孔性角化、およびいぼを治療するための多数の皮膚ケア製品における重要成分である。その皮膚細胞における効果の故に、サリチル酸はフケを治療するのに用いるいくつかのシャンプーに使われている。サリチル酸への曝露は過敏性を生じうる。

【0111】

細胞培養

初代ヒトケラチノサイトをProvitro (Berlin, Germany) から得た。細胞を10cmディッシュ1枚当たり3 x 10E5細胞でまいた。細胞を血清を含まず薬物を添加したケラチノサイト増殖培地 (Provitro) にて増殖して80~90%密度とした後に処理した。細胞を37 にて5%CO₂中で増殖した。実験には第2および第3継代の凍結保存後の播種を用いた。

【0112】

細胞の化学曝露

表2：バイオマーカーを発見するために用いた参照化学物質のリスト

【表2】

化学物質	化学物質/溶媒	最終試験濃度		LLNA EC3 (%)
		低	高	
2,4-ジニトロベンゼンスルホン酸 (DNBS)	DNBS/DMSO	4 μM	8 μM	1.98 (強)
ジニトロクロロベンゼン (DNCB)	DNCB/DMSO	4 μM	8 μM	0.05 (極強)
桂皮酸アルデヒド (CA)	CA/DMSO	38 μM	136 μM	2.8 (中度)
テトラメチルチウラムジスルフィド (TMTD)	TMTD/DMSO	8.3 μM	13.3 μM	5.2 (中度)
硫酸ニッケル	Ni/食塩水	250 μM	1,500 μM	偽陰性
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	SDS/食塩水	49 μM	60 μM	14 (偽陽性)
サリチル酸 (SA)	SA/DMSO	250 μM	5000 μM	非感作物質

10

20

30

40

50

【0113】

試験化学物質を加え、プレートを24時間37℃にて5%CO₂加湿インキュベーター内でインキュベートした。化学物質をDMSOに溶解するときに、0.1% DMSOの最終濃度を関連ネガティブ対照に用いた。24時間のインキュベーション後に、細胞を収穫し、2回PBSで洗浄した。

【0114】

細胞溶解とサンプル調製

細胞を4体積の100mM TEAB (炭酸水素トリエチルアンモニウム)、pH 8.5±0.1、1mM TCEP (トリス[2-カルボキシエチル]ホスフィン⁺HCl)、0.1% SDSに溶解した。細胞ペレットを溶解バッファーに懸濁した後、懸濁液を95℃にて10分間、熱ミキサー (Eppendorf、The rmomixer comfort) 中で加熱した。細胞溶解液を氷上で2分間、2回超音波処理し、その後、第2サイクルの加熱と超音波処理を行った。サンプルを次いで14,000gにて10分間遠心分離しそして上清をさらなる分析に用いるかまたは-80℃にて貯蔵した。

【0115】

タンパク質濃度の決定

タンパク質濃度をBradford試薬を用いて決定した。その結果を、BSA/IgG (50%/50%) から成る標準の希釈液の測定値から作成した標準曲線を用いて計算した。

【0116】

トリプシン消化と同重体質量タグ標識化

タンデム質量タグ (TMT) (Thermo Scientific) は一式のアミン反応性標識を含み、これらは重および軽同位体で合成されて同じ総質量を示すが衝突誘起解離 (CID) による活性化とその後のタンデム質量分析 (MS/MS) 後に異なる質量のレポートイオンを与える。

【0117】

1サンプル当たり100 µgまでのタンパク質溶液の同等物をプロテオームのプロファイル作成実験に用いた。参照プールは全サンプルのアリコートから作製し、それぞれのTMTシクスペックス標識反応に含ませた。サンプルの最終体積はMT標識バッファー (100mM TEAB pH 8.4~8.6、0.1% SDS) で1サンプル当たり100 µlに調節した。サンプルを、水中の20 mM TCEPをそれぞれ5.3 µL加えることにより、30分間室温にて還元し、次いでアセトニトリル中の150mM ヨードアセトアミドをそれぞれ5.5 µLを加えることにより、1時間室温にてアルキル化した。

【0118】

タンパク質を消化するために、100mM TEABバッファー pH 8.4~8.6中の10 µLの0.4 µg/µLトリプシン溶液 (配列決定グレードの改変トリプシン、Promega) をそれぞれのバイアルに加えて37℃にて18時間インキュベートした。消化したタンパク質サンプルをTMTシクスペックス試薬 (TMT6-126、TMT6-127、TMT6-128、TMT6-129、TMT6-130およびTMT6-131) を用いて標識した。TMTシクスペックス試薬をアセトニトリルに溶解して60mMの濃度とし、40.3 µLの対応する試薬溶液をサンプルバイアルに加え、サンプルを室温にて1時間インキュベートした。Tyr、SerおよびThr残基を逆臨時標識するために、8 µLのヒドロキシアミン水溶液 (5% w/v) を加え、15分間室温にてインキュベートした。TMTシクスペックス標識したサンプルを組み合わせて精製した。

【0119】

サンプル精製

サンプルを3mL水/アセトニトリル95:5+0.1% TFAでそれぞれ希釈し、次いでHLB Oasisカートリッジ (1cc、30mg、Waters) を用いて脱塩した。溶出画分をそれぞれさらに、自己作製カートリッジ (CHROMABOND 空カラム 15ml、Macherey-Nagel、650 µL SP Sephalos e Fast Flowを充填、Sigma) を用いて強カチオン交換により精製した。ペプチドを充填しかつ4mL水/アセトニトリル75:25+0.1% TFAで洗浄後、ペプチドを2mL H₂O: ACN75:25+400 mMの酢酸アンモニウムを用いて溶出した。サンプルを真空濃縮器中で乾燥し、それぞれ50 µL水/アセトニトリル95:5+0.1% TFAに溶解し、そして分析まで-20℃にて保存した。

【 0 1 2 0 】

液体クロマトグラフィとタンデム質量分析 (LC-MS/MS)

TMTシクスプレックス標識サンプルを高性能液クロマトグラフィ-タンデム質量分析 (HP LC-MS/MS) により測定した。例えば、5 μ L (5 μ g) の各サンプルを、CID (衝突誘起解離) およびHCD (高エネルギー衝突解離) モードで操作したエレクトロスプレーイオン化線形イオントラップ四重極Orbitrap質量分析計 (Thermo Scientific) に注入し、これを用いて測定した。このペプチド混合物をEksigent NanoLCでReprosil C18トラップカラム (10x0.1mm、5 μ m) およびReprosil C18分析カラム (400x0.075mm、3 μ m) を用いて流量350nL/分 (60分間、勾配: 5-30%アセトニトリル) で分離した。計器パラメーター: 解像 (MS=30,000; MS/MS=7,500)、衝突エネルギー (CID=35およびHCD=75) 単離幅 (CID=2u、HCD=1.5u)。

10

【 0 1 2 1 】

ピークリストをOrbitrap生データから、mascotジェネリックファイル (*.MGfデータファイル) としてProteome Discoverer (バージョン1.1; ThermoFisher、San Jose、USA) を用いて作製した。得られる*.mgfファイルをIPIヒトデータベース (バージョン3.68; 2011年2月) に対してMASCOT (バージョン2.2; MatrixScience、London、UK (質量分析データを用いる、配列データベースの検索による確率に基づくタンパク質同定)、Perkins DN、Pappin DJ、Creasy DM、Cottrell JS. Electrophoresis. 1999 Dec; 20(18): 3551-67) により検索した。ペプチドとタンパク質同定を次のパラメーターを用いて実施した: システインにおけるカルバミドメチル、N-末端部位およびリシンにおけるTMT改変は固定した改変として設定した。トリプシンを用いて酵素制限を行い、3つのミス切断を許容しかつ前駆体質量については許容質量耐性 \pm 10 ppmおよびフラグメントイオンについては0.05を許容した。対応するMASCOT結果ファイル (*.datデータファイル) をダウンロードし、そしてレポーターイオン強度とタンパク質同定を社内ツールで抽出した。レポーターイオン強度およびタンパク質同一性をリレーショナルMySQLデータベース (version 5.157; Oracle、Redwood Shores、USA) に送ってレポーターイオンのlog2比を計算した。

20

【 0 1 2 2 】

抽出したレポーターイオン強度のデータ前処理と相対的定量

1つのLC/MS/MS試験内の任意のレポーターイオンの一定積分 (constant integral) の仮定に基づくサムスケールリング (sum scaling) の方法により、質量タグの6つのレポーターイオン強度を同位体分布およびシステム偏差と関係付けた。加えて、全6つのタグが80 AU (任意のユニット) より小さくかつ2未満のタグのレポーターイオン強度が10 AUより小さい場合、これらのMS/MSスキャンをフィルターにかけて外した。レポーターイオンの相対強度はサンプル中のペプチドの相対量を表す。あるペプチド相対量の全サンプルに対する相対量を比較するために、各サンプル-対-プールした参照サンプル間の比を計算した。いくつかの実験においては、各サンプルの比を同じドナーから作られた各サンプルと各対照サンプルとの間で計算した。比をlog2変換して各ペプチドに対する参照測定値を得た。タンパク質レベルの相対的变化についての情報を得るために、1つのタンパク質同一性に属する各同定したペプチドに対するlog2参照レポーターイオン強度を幾何平均として平均した。

30

40

【 0 1 2 3 】

(実施例2) 統計解析と分類モデルの作製

感作物質および刺激物質のグループに属する参照化学物質ならびに適当な (ビヒクル) 対照のグループに属する参照化学物質を用いて候補タンパク質バイオマーカーを選択した。これらの化学物質を2つの異なる濃度で適用して濃度依存効果を探求した。

【 0 1 2 4 】

複数の仮説を検定するために、分散分析 (ANOVA、 $p \leq 0.05$) を計算して3クラス間の比較可能性のいずれかに関係するバイオマーカーを研究した。異なるドナーと生体複製物の分析から導入される分散を説明するために、線形混合効果モデル (LME: linear mixed-effects model) を用いてバイオマーカーを同定した。統計学的記述言語Rまたはデータ解析

50

ソフトウェアMeV (TIGR) バージョン4.3を全ての統計解析に用いた。その後、102種のタンパク質バイオマーカーのリストを得た(配列番号1~102)。そのリストを表1にそしてタンパク質配列を表4(図8)に詳しく掲げた。

【0125】

アッセイ用の候補タンパク質バイオマーカーの同定

感作物質と非感作物質の間の区別を可能にする候補タンパク質バイオマーカーを発見するために、表2に掲げたトレーニング化学物質を含む2つおよび4つの発見研究を次の通り実施した。

【0126】

第1の研究では、ドナーから得たケラチノサイトを、2種の刺激物質(45 μM SDS、60 μM SDS、250 μM SAおよび500 μM SA)、5種の感作物質(38 μM CA、136 μM CA、4 μM DNBS、8 μM DNBS、4 μM DNCB、8 μM DNCB、8.3 μM TMTD、13.3 μM TMTD、250 μM ニッケルおよび1500 μM ニッケル)および対照と共に2段階の濃度にてインキュベートした。分析を二重に実施した。

【0127】

第2の研究では、4つの異なるドナーから得たケラチノサイトを、2種の刺激物質(45 μM SDS、60 μM SDS、250 μM SA および 500 μM SA)、5種の感作物質(38 μM CA、136 μM CA、4 μM DNBS、8 μM DNBS、4 μM DNCB、8 μM DNCB、8.3 μM TMTD、13.3 μM TMTD、250 μM ニッケルおよび1500 μM ニッケル)および対照と共に2段階の濃度にてインキュベートした。各ドナーの分析を二重に実施して1つの化学物質当たり合計8つのサンプルを得た。

【0128】

統計解析の目的は、化学物質の感作化学物質(A=アレルゲン)または非感作化学物質(I=刺激物質)のグループへの割り当てを可能にする分類モデルを開発することであった。2つのデータセット(p<=0.05)を統計解析した後、候補バイオマーカーの最終リストを得た。2つのデータセットはそれぞれ、異なる感作能の化学アレルゲンならびにLINAで偽ネガティブな結果を与える金属イオンニッケルに関わった。従って、新しい化学物質を評価するまたは化学物質の色々な組み合わせを解析する本発明の方法の使用はバイオマーカー候補のデータベースの増加に寄与するであろう。第1のアプローチにおいては、最適な候補をp値の増加に基づいて上から下に格付けした。表1は、ケラチノサイトを一式のトレーニング化学物質へ曝露した後に有意に影響を受けたトップ102の候補バイオマーカーを示す。

【0129】

その結果、感作物質(A=アレルゲン)および非感作物質(I=刺激物質)は、ケラチノサイトまたはケラチノサイト株に発現される極く限られたセットの遺伝子産物: GAPDH、TXN、LIMA1、MTIG、RPL31、ANXA3、EIF3CLEIF3C、ARHGDI A、PCBP1、NAP1L1、HSPA1B; HSPA1A、AKR1C2、RPL1、EPS8、SERPINB2、VDAC3、ANXA1、CSTB、CLTC、EEF1A1、ANXA2、PKM2、ENO1、AHNAK、HSPA8、RT1、UBC; UBB; RPS27A、TKT、LGALS1、PKM2、TUBB、NPM1、NME1; ME2、THBS1、LDHA、KRT5、HSPA5、TMSB10、LAMC2、KRT1、SLC25A5、ACTB、EPPK1、CFL1、LAMB3、SYNCRIP、HBG1、GSTP1、ALDOA、RPL18、EEF2、RPL4、RPL6、KRT7、HNRNPA2B1、S100A6、TDRD6、KIAA1407、HIST1H2BL、PPIA、CAP1、TUFGM、SH3BGRL3、SPRR1B、ITGB4、RPL35、RPL34、S100A8、HSP90B1、HBA2/HBA1、SFN、HSP90AA1、S100A9、HSP70.1、KRT17、HSPBI、FASN、KRT6A、DSP、PRDX1、P4HB、HIST1H1E、RPL12、TUBA4A、TUBB3、YWHAG、VIM、FLNA、ANXA5、RPS28、RPLPO、LAMA3、HIST1H2AH、EIF4A1、MSN、KRT16、PGAM1、PDIA3、PP1B、LGALS7; LGALS7B、NCL、PRDX2の存在を測定することにより同定することができる。

【0130】

第2のアプローチにおいては、線形混合効果モデル(LME: linear mixed-effects model)を用いて本研究における各バイオマーカーに対するドナー成分間の分散を説明するのに用いた。LMEは感作物質/アレルゲン曝露に関係する47種のタンパク質バイオマーカーのサブセットおよび非感作物質/刺激物質曝露に関係する46種のタンパク質バイオマーカーのサブセットを生じた。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 1 】

LMEを用いて同定したアレルゲン特異的バイオマーカーのリストには次が含まれる：GAPDH、TXN、MT1G、NAP1L1、HSPA1B；HSPA1A、AKR1C2、AN A1、EEF1A1、PKM2、LDHA、KRT5、HSPA5、ACTB、RPL18、EEF2、PPIA、S100A8、HSP90B1、HBA2；HBA1、SFN、HSP90AA1、S100A9、HSP70.1、KRT17、HSPB1、FASN、RT6A、DSP、PRDX1、P4HB、HIST1H1E、RPL12、TUBA4A、TUBB3、YWHAG、VIM、FLNA、ANXA5、RPS28、RPLP0、LAMA3、HIST1H2AH、EIF4A1、MSN、KRT16、PGAM1、PDIA3。

【 0 1 3 2 】

LMEを用いて同定した刺激物質特異的バイオマーカーのリストには次が含まれる：GAPDH、TXN、ARHGDIA、PCBP1、HSPA1B；HSPA1A、RPL14、SERPINB2、VDAC3、ANXA1、CSTB、EEF1A1、ANXA2、PKM2、ENO1、AHNAK、HSPA8、KRT14、UBC；UBB；RPS27A、TUBB、NPM1、NME1；NME2、LDHA、KRT5、TMSB10、LAMC2、KRT1、SLC25A5、CFL1、LAMB3、HBG1、GSTP1、EEF2、RPL6、KRT7、S100A6、HSP90B1、HSP70.1、RT17、TUBA4A、RPS28、KRT16、PDIA3、PP1B、LGALS7；LGALS7B、NCL、PRDX2。

【 0 1 3 3 】

部分最小二乗判別分析 (PLS-DA)

部分最小二乗回帰 (PLS) 分析を実施して、2つの最初の潜在成分の負荷スコアを見ることにより最も有望なタンパク質を選択することも可能である (図1)。モデルを応答変数 (y) 「アレルゲン」および「刺激物質」ならびに予測因子 (x) としてANOVAおよびLMEフィルターしたタンパク質を用いて構築した。第1のPLS成分 (x軸) を第2のPLS成分 (y軸) に対してプロットした。応答変数「アレルゲン」に近いバイオマーカーは化学物質をポテンシャルアレルゲンとして分類する上で強い役割を有する。応答変数「刺激物質」に近いバイオマーカーは化学物質を刺激物質として同定する。PLS負荷プロット (図1) に基づいて、アレルゲンを同定するための12種の最も重要なタンパク質はグループ1 (表1) のタンパク質を含むものである。グループ2 (表1) は刺激物質 / 非感作物質を同定するための最も重要なタンパク質を含むものである。

【 0 1 3 4 】

グループ1：

GAPDH、TXN、LIMAI、MT1G、RPL31、ANXA3、EIF3CL；EIF3C、ARHGDIA、PCBP1、NAP1L1、HSPA1B；HSPA1A、AKR1C2

グループ2：

RPL14、EPS8、SERPINB2、VDAC3、ANXA1、CSTB

グループ3：

表1のグループ3は、化学刺激物質および感作物質の色々な組み合わせの試験に関わる4つの研究の少なくとも1つにおいて $p \leq 0.05$ の有意判定要件を合格するさらなる感作物質バイオマーカーを含有する。

【 0 1 3 5 】

化学物質を分類する好ましい方法は部分最小二乗回帰分析 (PLS) を使う方法である。図2は第2の研究の全サンプルについてお互いに対してプロットした2つの第1の主成分の対応するPLSスコアプロットを示す。このスコアプロットにおいて、各点は1つのサンプルを表す。102種のタンパク質バイオマーカーのリストに基づいて、感作物質と刺激物質で処理したサンプル間の良い分離が達成された。ニッケルで処理したサンプルはプロットの中から最大相対距離を有するが、TMTDはプロットを中心への距離がより小さいことを示し、ほとんどのサンプルにおいてTMTDがサンプルにより小さい応答を誘発することを示すことができる。

【 0 1 3 6 】

(実施例3) 標的化バイオマーカー測定

感作ポテンシャルを予測するマーカーを見出すための代替のアプローチとして、本発明者らは市販のイムノアッセイを用いてバイオマーカーの濃度を測定し、3種のバイオマーカーのレベルを測定した。ウェスタンプロットまたはELISAにより測定するこれらの3種

のタンパク質は、ストレス毒性経路のバイオマーカーの参考文献の総括に基づいて選択された。細胞を実施例1に記載の通り培養し、細胞抽出物を用いてELISAまたはウェスタンブロットにより直接分析した。全てのキットは製造業者取扱説明書に従って用いた。

【0137】

熱ショック70kDaタンパク質1 (HSP70、HSPA1A ; HSPA1B)

熱ショックタンパク質 (HSP) は分子シャペロンとして機能し、重要なタンパク質のミスフォールディングおよび凝集を防止しかつタンパク質の適当なフォールディングを支援する。HSPの発現は熱、トキシンおよび酸化ストレスにより増加する。70kDa熱ショックタンパク質 (Hsp70) は3つのメンバーHSPA1A、HSPA1B、およびHSPA1Lを含む。HSP70は皮膚に発現され、HSP70特異的抗体を用いるマウスにおけるHSP70の阻害は1-フルオロ-2,-ジニトロベンゼン接触過敏性応答の低下をもたらした (Yusuf et al. 2009)。接触感作物質および刺激物質のHSP70生産に与える効果はHSP70特異的ELISA (Assay Designs Inc. Ann Arbor, USA) を用いて確認した。HSP70発現の誘導を意味する一般ストレス応答に基づいて、これは全てのクラスの化学アレルゲンに対するマーカーであることが期待されうる。驚いたことに、この結果はHSP70がTMTDおよびCAにより最も強く誘導されるが、DNCB、ニッケルおよびDNCBに対する応答が小さいことを示す (図3)。

10

【0138】

メタロチオネイン-IG (MT1G)

メタロチオネイン (MT) は低分子量で、システインが豊富であり、亜鉛およびニッケルを含む金属を隔絶して細胞を金属毒性から保護するタンパク質である。MT発現は金属イオンによりおよび酸化ストレスモデルにおいて誘導される。さらに、MTは抗原に関連する気道炎症のマウスモデルにおいて細胞を保護する役割を果たすようである。(Inoue et al. 2009の総括)。接触感作物質および刺激物質のMT1G生産に与える効果を、MT1G特異的抗体 (クローンUCIMT、Biozol、Eching、Germany) を用いるウェスタンブロット分析により確認した。驚いたことに、その結果は金属アレルゲンニッケルおよびDNCBと比較して、TMTDに曝したケラチノサイトにおいて、MT1Gが最も強く誘導されることを示した (図5)。

20

【0139】

アルド-ケトレダクターゼC1 (AKR1C2)

アルド-ケトレダクターゼファミリー-1、メンバーC2 (AKR1C2) はアルドノケトレダクターゼスーパーファミリーのメンバーであり、このメンバーはNADHおよび/またはNADPHを補因子として用いてアルデヒドおよびケトンのそれらに対応するアルコールへの転化を触媒する。AKR1C2遺伝子発現のアップレギュレーションがDNBSおよびニッケルを含む皮膚感作物質に曝した樹状細胞において記載されている (Gildea et al. 2006)。接触感作物質および刺激物質のAKR1C2生産に与える効果を、AKR1C2特異的ウサギポリクローナル抗体 (Antibodies-Online、Aachen、Germany) を用いるウェスタンブロット分析により確認した。対照的に、樹状細胞AKR1C3はCAに曝したサンプルでだけ誘導された (図4)。これらの結果は、樹状細胞とケラチノサイトにおける化学感作物質に対する応答経路の誘導には実質的な相違が存在することを示す。

30

【0140】

(実施例5) 一般的な感作物質に対するバイオマーカーパネル

実施例1~4の結果は、化学感作物質を刺激物質または対照化学物質から識別するための102種のタンパク質のパネル (表1、グループ1~3) を同定した。今や、参照化学物質を用いて102種のバイオマーカーのパネルを決定する記載した方法を改定した形で用いて、新しくまたは今まで未試験の化学物質を試験し、それらのアレルゲン、感作物質または非感作物質としてのポテンシャルを決定することができる。本発明によるその方法は新しい化学物質にまたは、ポジティブおよびネガティブ対照としての参照化学物質と組み合わせた新しい化学物質に曝したサンプルの試験セット中の表1から選んだバイオマーカーの濃度を測定する方法を使うことができる。典型的には、新しい試験化学物質を評価する際に、その分析は表1からのバイオマーカーの組み合わせを用いて、とりわけグループ1または

40

50

グループ2からのバイオマーカーを選択して実施すべきである。グループ1およびグループ2から選択されるバイオマーカーのパネルの使用は、感作物質、刺激物質および対照の間の最も堅牢な組み合わせを確実なものにするであろう。選択したバイオマーカーが新しい化合物について巧く行けば、そのバイオマーカーの組み合わせを保持しうる。あるいは、グループ1または2からのプロセスを繰り返して他のバイオマーカーの組み合わせを試験することができる。また、グループ1または2からのバイオマーカーを拒絶し、グループ3からのバイオマーカーを含むこともできる。この繰り返しプロセスを優れた分類モデルが得られるまで続けうる。特定の例においては、DNCBなどの化学感作物質のより高い用量も皮膚刺激を引き起しうる。SDSなどの化学刺激物質は生得的免疫応答の活性化を介して皮膚炎症を引き起すと考えられる。

10

【0141】

化学物質の感作ポテンシャルを決定する場合、その分析は刺激性および非刺激性濃度を含む曝露濃度を増加する試験も関わりうる。

【0142】

表1に記載のバイオマーカーの濃度を測定することにより化学物質の刺激ポテンシャルを測定することも可能である。典型的には、分析は炎症性および細胞のストレスプロセスと連結したバイオマーカーを用いて実施すべきである。特に、SDSへの曝露後に誘導されるグループ2から選択されるバイオマーカーが有用でありうる。これは、限定されるものでないが、Serpina2 (プラスミノゲン活性化インヒビター-2、PAI-2)、皮膚創傷修復に関わるセリンプロテアーゼインヒビター、EPS8 (表皮成長因子受容体キナーゼ基質8)、アクチン再造形に関わるタンパク質およびCTSB (システインB)、システインプロテアーゼの細胞内インヒビターの濃度を測定することに関わりうる。本発明にとって特に価値高いのは、炎症プロセスに関わるANXA1 (アネキシン1) 形質膜に結合したタンパク質である。刺激物質に対する他のマーカーには、VDAC3 (電位依存性アニオン選択チャンネルタンパク質3)、ミトコンドリア外膜に主に位置する細孔形成タンパク質、およびRPL14 (60Sリボソームタンパク質L14) が含まれる。感作または刺激化学物質によりモジュレートされるタンパク質の封入および組み合わせは、新しい化学物質の感作または刺激ポテンシャルを正しく予測することを可能にするであろう。

20

【0143】

(実施例6) 接触感作物質のバイオマーカーパネル

感作ポテンシャルの一般的マーカーのパネル内で、接触感作物質効果に関連する最強識別マーカーを選択することもできる。PLS-DA (PLS判別分析) を用いて、全ての他のクラスから皮膚感作物質の最強分離を提供する12種のタンパク質のサブグループを同定した (表1、グループ1)。従って丁度これらの12種のタンパク質を測定する標的化分析を実施して既知の皮膚感作物質を検出し、未知の試験化学物質または化学物質の組み合わせが皮膚感作ポテンシャルを有するかどうかを実証することができる。

30

【0144】

(実施例7) バイオマーカーの多重分析用の選択反応モニタリング (SRM) アッセイ

色々な化学感作物質アッセイに対する複雑かつ可変の細胞応答にアプローチするためには、色々な細胞の応答経路を表すいくつかのバイオマーカーの同時分析を可能にするアッセイが必要である。SRMに基づくアプローチは、技法の感度と選択性、多重化能力および抗体の限られた利用可能性の故に、魅力的なELISAの代替法である。本技法では、目的のタンパク質に一意的なサインペプチドを測定し、サンプル中のタンパク質の定量的な情報を提供する。化学曝露実験に反応するペプチド存在量の変化は、典型的な同位体TMT-SRの作業手順を用いて決定することができる。本技法において、定量はTMTゼロで標識したサンプルペプチド-対-TMTシックスプレックス重同位体で標識した内部参照サンプルの相対MS強度に基づいて行われる。4種のタンパク質：チモシン-10 (TYB10)、タンパク質S100-A8 (S100A8)、タンパク質S100-A9 (S100A9) および熱ショック同族71kDaタンパク質 (HSPA8) を選択して多重SRMアッセイを開発した。

40

【0145】

50

方法

SRM定量のための候補ペプチドの選択

現存するMS/MSデータを用いて、最も高頻度で観察される特異的なペプチドを定量のために選択した。もし可能であれば、SRM開発のためにタンパク質1種当たり少なくとも3種のペプチドを選択した。4種の選択したタンパク質（HSPA8、S100A8、S100A9およびTYB10）に対する代表的ペプチドを（図9）に示した。選択のための判定基準には次が含まれる：トリプシンによる切断ミスのないことおよび可変性の修飾がないこと（in vivoまたは実験において）。

【0146】

サンプルの調製

ケラチノサイトサンプルを感作物質および刺激物質で処置するかまたは発見フェーズのまま無処理で置いた。プールしたサンプルをトリプシンで消化しかつTMTシクスプレックスで標識して、定量の参照となるペプチドの重標識バージョンを作製した。試験サンプルを消化しかつTMTゼロで標識して、ペプチドの軽標識バージョンを作製した。各15 µgのプールおよび試験サンプルをその後に混合し、固相抽出による引き続いての精製および揮発性バッファーを用いる強カチオン交換を実施した。

【0147】

サンプルのSRM分析

混合した重および軽標識サンプルを5%アセトニトリル (=ACN)、0.2%蟻酸 (=FA) に再懸濁し、TSQ Vantage三連四重極質量分析計 (Thermo Fisher) と結合したAccela 1250液体クロマトグラフィ (LC) 系に注入してSRMデータを得た。対応するTMT六重体 (sixplex) 標識およびTMTゼロ標識をしたフラグメントイオン質量を計算し、そしてMS計器パラメーターを個々のQ1およびQ3遷移対について最適化した。プールした細胞溶解液サンプルを消化し、TMT六重体 (sixplex) で標識し、そしてTMTゼロ標識した試験サンプルと組み合わせた。各ペプチドに対する正確な保持時間を用いると、各SRM遷移に与えられた走査時間を最大化するために用いた保持時間ウィンドウでSRMサイクル時間は1.5秒であった。洗浄およびカラムを平衡化する時間を含めて、本方法の総試験時間は23分であった。脱クラスター電圧を5ボルトに設定し、ピーク幅 (FWHM) を0.5に設定し、そしてクロムフィルターピーク幅を6秒に設定した。SRMアッセイは153種のSRM遷移を含み、19ペプチドと11タンパク質をカバーした。SRM遷移に対する特異的パラメーターを表5 (図9) に掲げた。

【0148】

データ解析

SRMをSkylineバージョン1.2.0.3425 (<https://skyline.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view>) を介して可視化しかつ全てのピーク整合を可視的に実証した。ピーク面積をMicrosoft Excelに出力した。遷移を合計して各ペプチドに対する全遷移の総強度を得た。内因性 (軽) ペプチドの量を、内部の重標識した参照サンプルに対する相対的なピーク面積比に基づいて計算した。

【0149】

参考文献

10

20

30

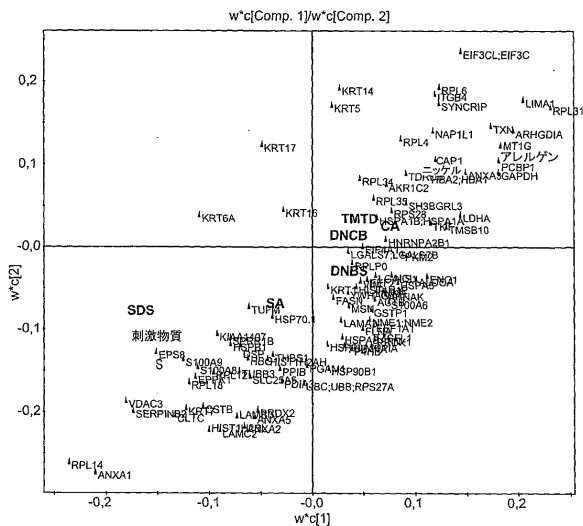
- Corsini E, Mitjans M, Galbiati V, Lucchi L, Galli CL, Marinovich M (2009). Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. *Toxicol In Vitro*. 23(5):789-96.
- Emter R, Ellis G, Natsch A (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 245(3):281-90.
- Gildea LA, Ryan CA, Foertsch LM, Kennedy JM, Dearman RJ, Kimber I, Gerberick GF. (2006) Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J Invest Dermatol*. 126(8):1813-22. 10
- Inoue K, Takano H, Shimada A, Satoh M (2009). Metallothionein as an anti-inflammatory mediator. *Mediators Inflamm*. 2009:101659.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Scholes, E.W., Ladics, G.S., Loveless, S.E., House, R.V., Guy, A., (1995). An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* 103, 63-73. 20
- Magnusson, B., Kligman, A.M., (1969). The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol*. 52, 268-276.
- Natsch A, Emter R (2008). Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicol Sci*. 102(1):110-9.
- Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers--functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol Sci*. 113:284-92. 30
- Vandebriel RJ, Pennings JL, Baken KA, Pronk TE, Boorsma A, Gottschalk R, Van Loveren H (2010). Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. *Toxicol Sci*. 2010 117(1):81-9.
- Van Och FM, Van Loveren H, Van Wolfswinkel JC, Machielsen AJ, Vandebriel RJ (2005). Assessment of potency of allergenic activity of low molecular weight compounds based on IL-1alpha and IL-18 production by a murine and human keratinocyte cell line. *Toxicology*. 210(2-3):95-109. 40

Yoshikawa Y, Sasahara Y, Kitano Y, Kanazawa N, Shima H, Hashimoto-Tamaoki T (2010). Upregulation of genes orchestrating keratinocyte differentiation, including the novel marker gene ID2, by contact sensitizers in human bulge-derived keratinocytes. *J Biochem Mol Toxicol.* 24(1):10-20.

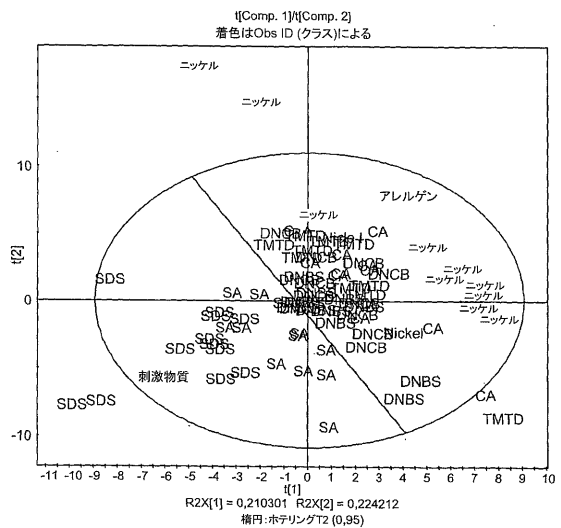
Yusuf N, Nasti TH, Huang CM, Huber BS, Jaleel T, Lin HY, Xu H, Elmets CA (2009). Heat shock proteins HSP27 and HSP70 are present in the skin and are important mediators of allergic contact hypersensitivity. *J Immunol.* 182(1):675-83.

Kimber I, Basketter DA, McFadden JP, Dearman RJ (2011). Characterization of skin sensitizing chemicals: a lesson learnt from nickel allergy. *J Immunotoxicol.* (1):1-2.

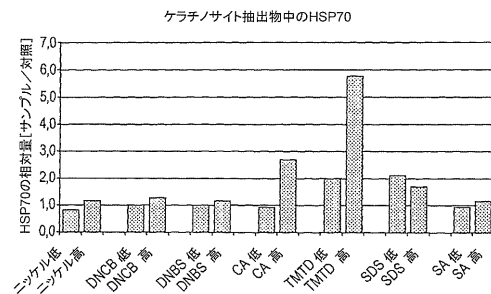
【 図 1 】



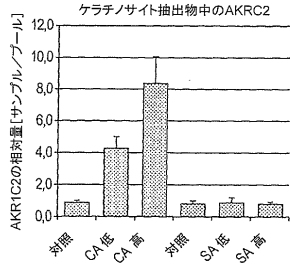
【 図 2 】



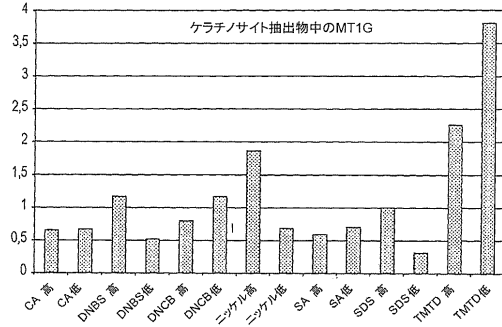
【 図 3 】



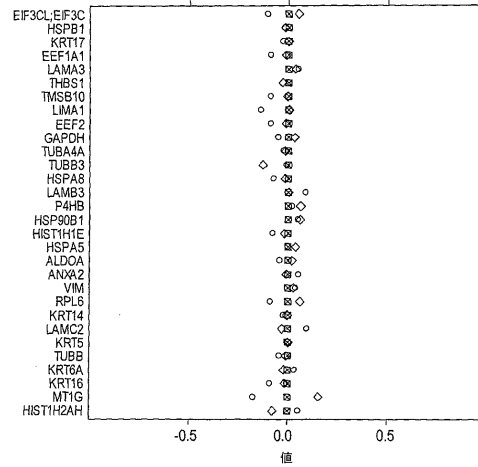
【 図 4 】



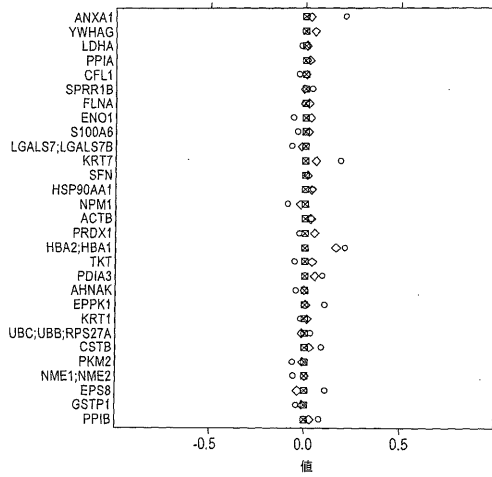
【 図 5 】



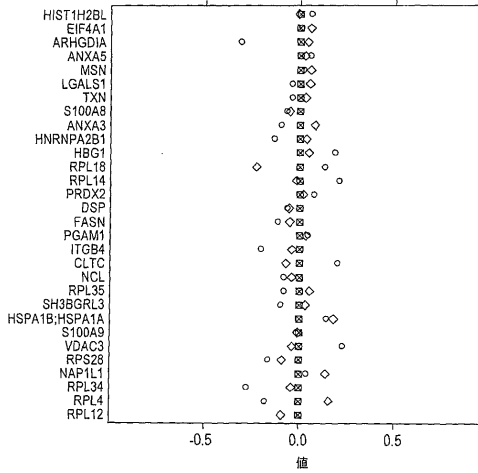
【 図 6 A 】



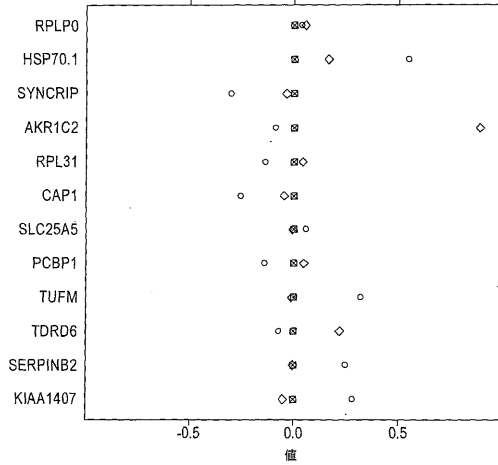
【 図 6 B 】



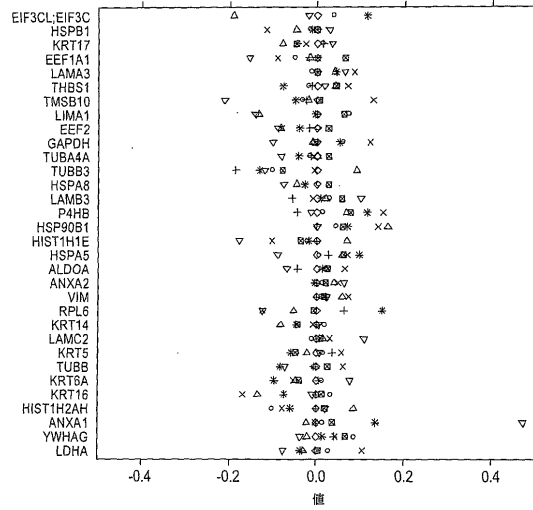
【 図 6 C 】



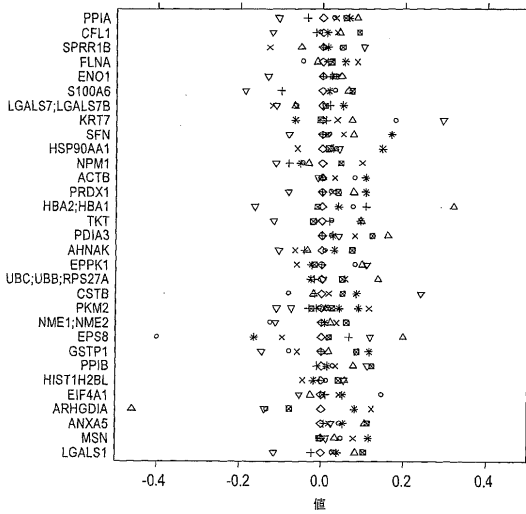
【図6D】



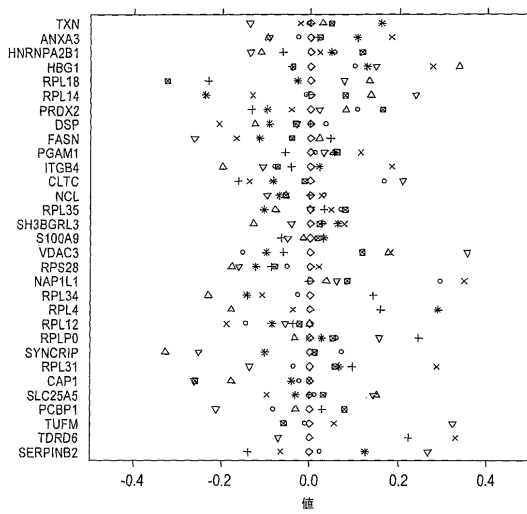
【図7A】



【図7B】



【図7C】



【図 9 - 1】

分析物	ペプチド配列	TMT 標識	m/z (Q1)	m/z (Q3)	フラグメント イオンの型	衝突 エネルギー	スタート 時間	ストップ 時間
HSPA8	GTLDPEVK	軽	653.8 80455	611.335 88	b4	29	9.5	11.6
HSPA8	GTLDPEVK	軽	653.8 80455	696.425 03	y4	30	9.5	11.6
HSPA8	GTLDPEVK	軽	653.8 80455	811.451 973	y5	31	9.5	11.6
HSPA8	GTLDPEVK	軽	653.8 80455	936.499 651	b7	31	9.5	11.6
HSPA8	GTLDPEVK	重	658.8 90855	616.346 28	b4	29	9.5	11.6
HSPA8	GTLDPEVK	重	658.8 90855	701.435 43	y4	30	9.5	11.6
HSPA8	GTLDPEVK	重	658.8 90855	816.462 373	y5	31	9.5	11.6
HSPA8	GTLDPEVK	重	658.8 90855	941.510 051	b7	31	9.5	11.6
HSPA8	TVTNAVTVFPAY FNDSQR	軽	736.0 53596	640.362 429	b4	47	11.2	12.9
HSPA8	TVTNAVTVFPAY FNDSQR	軽	736.0 53596	711.399 543	b5	36	11.2	12.9
HSPA8	TVTNAVTVFPAY FNDSQR	軽	736.0 53596	810.467 937	b6	32	11.2	12.9
HSPA8	TVTNAVTVFPAY FNDSQR	軽	736.0 53596	1097.50 1048	y9	28	11.2	12.9
HSPA8	TVTNAVTVFPAY FNDSQR	重	737.7 23729	645.372 829	b4	47	11.2	12.9
HSPA8	TVTNAVTVFPAY FNDSQR	重	737.7 23729	716.409 943	b5	36	11.2	12.9
HSPA8	TVTNAVTVFPAY FNDSQR	重	737.7 23729	815.478 357	b6	32	11.2	12.9
HSPA8	TVTNAVTVFPAY FNDSQR	重	737.7 23729	1097.50 1049	y9	28	11.2	12.9
S100A 8	ALNSIIDVYHK	軽	574.3 35375	610.351 865	b4	31	11.4	12.9
S100A 8	ALNSIIDVYHK	軽	574.3 35375	723.435 929	b5	27	11.4	12.9
S100A 8	ALNSIIDVYHK	軽	574.3 35375	885.478 856	y5	26	11.4	12.9
S100A 8	ALNSIIDVYHK	軽	574.3 35375	951.546 936	b7	27	11.4	12.9
S100A 8	ALNSIIDVYHK	重	577.6 75642	615.362 265	b4	31	11.4	12.9
S100A 8	ALNSIIDVYHK	重	577.6 75642	728.446 329	b5	27	11.4	12.9
S100A 8	ALNSIIDVYHK	重	577.6 75642	890.489 256	y5	26	11.4	12.9
S100A 8	ALNSIIDVYHK	重	577.6 75642	956.557 336	b7	27	11.4	12.9
S100A 9	LGHPPDTLNQGEF K	軽	635.3 4471	704.393 73	y4	25	10	11.6
S100A 9	LGHPPDTLNQGEF K	軽	635.3 4471	946.495 235	y6	26	10	11.6

【図 9 - 2】

S100A 9	LGHPPDTLNQGEF K	軽	635.3 4471	958.531 62	b7	25	10	11.6
S100A 9	LGHPPDTLNQGEF K	軽	635.3 4471	1072.57 4548	b8	28	10	11.6
S100A 9	LGHPPDTLNQGEF K	重	638.6 84977	709.404 13	y4	25	10	11.6
S100A 9	LGHPPDTLNQGEF K	重	638.6 84977	951.505 635	y6	26	10	11.6
S100A 9	LGHPPDTLNQGEF K	重	638.6 84977	963.542 02	b7	25	10	11.6
S100A 9	LGHPPDTLNQGEF K	重	638.6 84977	1077.58 4948	b8	28	10	11.6
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	軽	752.4 16646	682.372 994	b4	42	12.4	14.2
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	軽	752.4 16646	720.425 03	y4	35	12.4	14.2
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	軽	752.4 16646	795.457 058	b5	38	12.4	14.2
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	軽	752.4 16646	908.541 122	b6	35	12.4	14.2
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	重	755.7 56912	687.383 394	b4	42	12.4	14.2
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	重	755.7 56912	725.435 43	y4	35	12.4	14.2
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	重	755.7 56912	800.467 458	b5	38	12.4	14.2
S100A 9	NIETIINTFHQY SVK	重	755.7 56912	913.551 522	b6	35	12.4	14.2
TYB10	ETIEQEK	軽	662.8 67545	628.362 429	y3	34	8.4	10.5
TYB10	ETIEQEK	軽	662.8 67545	697.372 66	b4	37	8.4	10.5
TYB10	ETIEQEK	軽	662.8 67545	757.405 023	y4	34	8.4	10.5
TYB10	ETIEQEK	軽	662.8 67545	971.536 765	y6	31	8.4	10.5
TYB10	ETIEQEK	重	667.8 77945	633.372 829	y3	34	8.4	10.5
TYB10	ETIEQEK	重	667.8 77945	702.383 06	b4	37	8.4	10.5
TYB10	ETIEQEK	重	667.8 77945	762.415 423	y4	34	8.4	10.5
TYB10	ETIEQEK	重	667.8 77945	976.547 165	y6	31	8.4	10.5

【配列表】

000622458500001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 7/00
- (72)発明者 ゼルツァー, シュテファン
ドイツ連邦共和国 デー - 6 6 6 7 9 ロースハイム アム ゼー, エーリンガーシュトラッセ
9
- (72)発明者 コンカレピック, ササ
ドイツ連邦共和国 デー - 9 7 5 2 6 ゼンフェルト, プファーラー - ジクスト シュトラッセ
1 6
- (72)発明者 クーン, カルステン
ドイツ連邦共和国 デー - 6 5 7 1 9 ホフハイム アム タウヌス, ウービアシュトラッセ 1
3
- (72)発明者 パイク, イアン
イギリス国 ティーエヌ104エルビー トンブリッジ ケント, コリン プライス ロード 5
- (72)発明者 ユング, シュテファン
ドイツ連邦共和国 デー - 5 5 1 2 2 マインツ, フリッツ - コール - シュトラッセ 1 5

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0305276 (US, A1)
特開2007 - 240321 (JP, A)
特表2003 - 512626 (JP, A)
特開2004 - 267090 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	确定化合物敏感性的材料和方法		
公开(公告)号	JP6224585B2	公开(公告)日	2017-11-01
申请号	JP2014524448	申请日	2012-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	电泳有限公司		
申请(专利权)人(译)	电Foret的遗传学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	电Foret的遗传学有限公司		
[标]发明人	ブツデペトラ ツヒトハンスディーター ゼルツァーシュテファン コンカレビツクササ クーンカルステン パイクイアン ユングシュテファン		
发明人	ブツデ,ペトラ ツヒト,ハンス-ディーター ゼルツァー,シュテファン コンカレビツク,ササ クーン,カルステン パイク,イアン ユング,シュテファン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/68 C07K7/00		
CPC分类号	G01N33/5023 G01N33/6881 G01N2800/24		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/53.N G01N33/53.D G01N33/543.501.A C12Q1/68.ZNA.A C07K7/00		
代理人(译)	石川彻		
优先权	2011013814 2011-08-10 GB		
其他公开文献	JP2014522990A5 JP2014522990A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及细胞的体外蛋白质组学分析，其确定化合物对所述细胞的致敏潜力（包括过敏潜力）。提供了几种蛋白质标记物，其允许进行测定以确定化学物质是否具有接触敏化剂的敏化潜力。【选择图】无

(45) 発行日 平成29年11月1日 (2017.11.1)

(24) 登録日 平成29年10月13日 (2017.10.13)

(5) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)
GO 1 N 33/543 (2006.01)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)
CO 7 K 7/00 (2006.01)

GO 1 N 33/53 Q
GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 5 O 1 A
C 1 2 Q 1/68 Z N A A

請求項の数 19 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-524448 (P2014-524448)
(86) (22) 出願日 平成24年8月10日 (2012.8.10)
(65) 公表番号 特表2014-522990 (P2014-522990A)
(43) 公表日 平成26年9月8日 (2014.9.8)
(86) 国際出願番号 PCT/GB2012/051952
(87) 国際公開番号 W02013/021210
(87) 国際公開日 平成25年2月14日 (2013.2.14)
審査請求日 平成27年5月14日 (2015.5.14)
(31) 優先権主張番号 1113814.6
(32) 優先日 平成23年8月10日 (2011.8.10)
(33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 505423678
エレクトロフォレティクス リミテッド
イギリス国 WC 1 H 9 B B ロンドン
マブレドン プレイス ハミルトン ハ
ウス
(74) 代理人 100097456
弁理士 石川 徹
ブッチ、ベトラ
(72) 発明者
ドイツ連邦共和国 デー-6 0 4 3 7 フ
ランクフルト アム マイン、アム エン
チンプフアド 1 4
(72) 発明者
ツヒト、ハンズ-ディーター
ドイツ連邦共和国 デー-3 0 5 3 9 ハ
ノーファー、ゲルディングシュトゥーセ
1 0 ベー
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化合物の感受性ポテンシャルを決定するための材料と方法