

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2021-175382

(P2021-175382A)

(43) 公開日 令和3年11月4日(2021.11.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Q	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
C 1 2 Q 1/6883 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6883 Z	
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813 Z	
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 45 頁)		

(21) 出願番号 特願2020-81503 (P2020-81503)
 (22) 出願日 令和2年5月1日(2020.5.1)

(71) 出願人 000000918
 花王株式会社
 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
 〇号
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (72) 発明者 志摩 恭子
 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株
 式会社研究所内
 (72) 発明者 高田 直人
 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株
 式会社研究所内
 (72) 発明者 井上 高良
 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株
 式会社研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法

(57) 【要約】

【課題】乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するためのマーカー、及び該マーカーを用いた乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法を提供する

【解決手段】被験者から採取された生体試料について、IMP DH 2、E R I 1、F B X W 2、S T K 1 7 B、T A G L N 2、A M I C A 1及びH N R N P A 1からなる7種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルを測定する工程を含む、当該被験者における乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験者から採取された生体試料について、IMPDPH2、ERI1、FBXW2、STK17B、TAGLN2、AMICA1及びHNRNPA1からなる7種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルを測定する工程を含む、当該被験者における乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法。

【請求項 2】

IMPDPH2、ERI1及びFBXW2からなる3種の遺伝子群より選択される遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定を少なくとも含む、請求項1記載の乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法。

10

【請求項 3】

遺伝子又はその発現産物の発現レベルがmRNAの発現量の測定である、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 4】

遺伝子又はその発現産物が前記被験者の皮膚表上脂質に含まれるRNAである、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

発現レベルの測定値を前記各遺伝子又はその発現産物の参照値と比較し、乳幼児アトピー性皮膚炎の存在又は不存在を評価する、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6】

アトピー性皮膚炎罹患児由来の前記遺伝子又はその発現産物の発現レベルと、健常児由来の同遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定値を教師サンプルとして、アトピー性皮膚炎罹患児と健常児を分ける判別式を作成し、被験者から採取された生体試料から得られた同遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定値を当該判別式に代入し、得られた結果を参照値と比較することによって、被験者における乳幼児アトピー性皮膚炎の存在又は不存在を評価する、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

20

【請求項 7】

前記7種の遺伝子群の全ての遺伝子又はその発現産物の発現レベルが測定される、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

前記7種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子の他に、下記表3-1～3-3で示される100種、表4で示される9種のうち前記7種の遺伝子を除いた遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルが測定される、請求項6又は7記載の方法。

30

表 3 - 1		表 3 - 2		表 3 - 3		表 4	
*	AMICA1	*	U2AF1	*	PLIN2		CCL17
*	FBXW2	*	VPS13C	*	CDC42EP1		PYCARD
	PYCARD	*	SNX8	*	CCM2	*	IMPDH2
*	STK17B	*	NBPF10	*	RNF24	*	ERI1
	DNAJB11	*	ZNF430	*	SRPK2	*	FBXW2
*	ERI1	*	SPEN	*	LST1	*	STK17B
*	ECH1	*	CIB1	*	YPEL2	*	TAGLN2
*	MED14	*	TMEM33	*	INF2	*	AMICA1
*	HYOU1	*	NPEPPS	*	AMD1	*	HNRNPA1
	MAP1LC3B2	*	SEC24D		ITGAM		
	IL7R	*	SLC7A11	*	IMPDH2		
*	CTDSP1	*	ARHGDIB	*	CAPG		
*	USP16	*	C10orf128	*	VKORC1		
*	HNRNPA1	*	HNRNPUL1	*	ACSL4		
	CCL17	*	TXN2	*	CDC123		
*	UBE2R2		CISH	*	SCARNA7		
*	SDHD	*	YWHAG	*	RNASET2		
	AREG	*	GPT2	*	RLF		
*	TXNDC17	*	KIAA0930	*	C6orf62		
*	FBXW4	*	LAMTOR4	*	SLC39A8		
*	FBP1	*	CRCP	*	ARHGAP9		
*	FAM100B	*	CLEC4A	*	NDUFS7		
*	PDIA3P	*	STT3A	*	SEC61G		
*	ZNF91	*	CRISPLD2		SCAP		
*	RBM17	*	DEFB4B	*	TMEM214		
*	PRPF38B	*	CD93	*	USF2		
*	ATP5H	*	PLIN3				
*	BAX	*	USMG5				
*	ALYREF	*	LOC285359				
*	HK2	*	SLC20A1				
*	PRMT1	*	MSL1				
*	CTSC	*	SLC11A2				
*	SNRPD1	*	KHDRBS1				
*	TAGLN2	*	ABHD8				
*	CYTIP	*	CORO1B				
*	CASS4	*	ZFAND2A				
*	SNORA6		DOK2				

10

20

30

40

【請求項 9】

前記 7 種の遺伝子群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子の他に、下記表 1 - 1 ~ 1 - 9 で示される 371 種のうち前記 7 種に含まれる遺伝子を除いた遺伝子群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルが測定される、請求項 6 又は 7 記載の方法。

表 1 - 1		表 1 - 2		表 1 - 3		表 1 - 4		表 1 - 5	
	DEFB1	*	NTAN1	*	FAM222B	*	GDPD3	*	MIEN1
*	AGR2	*	CDKN2B	*	DHCR7		FAR2		SCD
	GAL	*	PLIN2		CCL3	*	KRT80	*	VKORC1L1
	CLU	*	MARCKS	*	FBXO32	*	EPHX3	*	ABTB2
*	SPNS2	*	RMND5B		CDSN	*	LCE2C	*	AATK
	HLA-A	*	NCCRP1	*	CARD18	*	DNAJB1	*	TUFT1
*	DNASE1L2		SLC15A1	*	MGST1	*	NEDD4L	*	MEA1
*	MEST	*	GBA2		WASL		POR	*	HDAC7
*	HES4	*	SPAG1	*	TEX264	*	IRAK2	*	PHLDA2
*	FAM108C1		KRT17	*	LCE1C	*	KCTD11	*	MAP1LC3B2
*	KRT79	*	H1FO		KLK13	*	KRT8	*	TMED3
*	ARL5A	*	RARG		INPPL1	*	SMPD3		PRR24
*	ALDH3B2		KLK11		SORT1		CD48		SBSN
*	CALML3	*	KRTAP4-9	*	STARD5	*	RSC1A1	*	HIST1H2BK
*	PLCD3	*	SULT2B1	*	TMEM189	*	PLD3	*	SURF1
*	OXR1	*	WIP1		A2M	*	HN1L	*	DUSP14
*	ABHD8	*	RUSC2	*	LY6G6C	*	PGRMC2	*	FAM214A
*	UNC5B	*	SMOX	*	ATP6V1C2	*	KDSR	*	FAM102A
*	HSBP1L1	*	GCH1	*	LYPD5	*	PPDPF	*	DNAJC5
*	MARCH3	*	MAPK13	*	BMP2	*	LYPLA1	*	TBC1D17
	ASPRV1	*	MYZAP	*	HIP1R	*	SDCBP2	*	SH3D21
*	CRAT	*	HS3ST6	*	S100A16	*	ADIPOR2	*	MPZL3
	DMKN	*	KRTAP12-1	*	C1orf21	*	SSFA2	*	EPB41
*	PLB1		PSORS1C2	*	KLHL21		BCL2L1	*	UBAP1
*	CDC34	*	CIDEA	*	GAS7	*	YPEL2	*	LRP10
*	FAM84B	*	DSP	*	LCE1F	*	ISG15	*	PAPL
	CTSA	*	C15orf62	*	PARD6B	*	GTPBP2	*	RALGDS
*	TSPAN6	*	DHCR24	*	TM4SF1	*	DDHD1		SHB
*	GPT2	*	KRT34	*	FOXO3	*	GALNT1	*	TRIM29
*	KRTAP5-5		PCDH1	*	GDE1	*	CRK		DGAT2
*	SEPT5	*	ZDHHC9	*	SH3BP5L	*	TMEM86A	*	ADIPOR1
*	MSMO1	*	GNG12	*	MAL2	*	HSPA1B	*	LCE2A
*	RRAD	*	CTNNBIP1	*	SLC31A1	*	PTK6	*	BASP1
*	CHAC1	*	FAM193B	*	BNIP3	*	DUSP16	*	RASAL1
*	SLC40A1	*	ID1	*	FAM100B		SLPI	*	GIPC1
*	NIPAL2	*	KRT86	*	PLA2G4E	*	FCHSD1	*	CLTB
*	SPTLC3	*	KRTAP3-1	*	SLAMF7	*	SNX18	*	UBIAD1
*	EPN3	*	LCE2D		LCN2	*	RASA4CP	*	BPGM
	KLK6	*	THRSP	*	C2orf54	*	CPEB4	*	LPCAT1
*	KLHDC3	*	NR1D1	*	PIK3AP1	*	RAB27A	*	RANGAP1
*	RNF217	*	IRGQ	*	ATMIN	*	AKTIP	*	RLF
	CA6	*	CYB5R1	*	KIAA0513	*	RGP1	*	PRSS22

10

20

30

表 1 - 6		表 1 - 7		表 1 - 8		表 1 - 9	
*	CTSD	*	EIF4EBP2	*	KCNQ10T1	*	SYNGR2
*	KIAA0930	*	ATG2A		CAST	*	SDHD
*	HIST3H2A	*	RAD23B	*	CHMP5	*	TGFBI
*	SMS	*	DSTN	*	TNIP1	*	NDUFS7
	LGALS3	*	TPRA1	*	SIRPA	*	DDOST
*	TBC1D20	*	BICD2	*	GLRX	*	TUBA1A
*	SERINC2	*	RNF11	*	NOTCH2NL	*	ECH1
*	KCTD20	*	ULK1	*	SLK	*	IMPDH2
*	FAM188A	*	SYTL1	*	ZFP36L2	*	CASS4
*	ASS1	*	MGLL	*	RAB21		LGALS1
*	ZNF664	*	WBP2	*	EIF5		IL7R
*	UBE2R2	*	NUDT4	*	PRELID1	*	CD52
*	PPP2CB	*	USF2	*	SQRDL	*	HLA-DMA
*	GOLGA4	*	PIM1	*	SERP1	*	CCND2
*	ZRANB1	*	SYPL1	*	RAB7A	*	S100A4
	EHF	*	OTUD5	*	ARF1	*	ERI1
*	TSPAN14	*	IRAK1	*	NDUFA1	*	FBXW2
*	HK2	*	UPK3BL		ENO1		PYCARD
	KEAP1	*	PTK2B	*	H2AFY	*	TMX2
	ABHD5	*	MAPK3	*	GNB2L1	*	HLA-DOA
*	NEU1	*	KRT23	*	EIF3K		MMP12
*	OSBPL2	*	UBXN6	*	DBI	*	CIITA
*	RNF103	*	ATP6V0C	*	SH3BGRL3	*	ADAM19
*	FEM1B	*	ZFAND6	*	PDIA3P	*	ANPEP
*	RANBP9	*	SIAH2	*	NDUFB11	*	MAT2A
*	LOC100093631	*	NBR1	*	YWHAH	*	CLEC4A
*	MAP1LC3A	*	ZFAND5		CALR		MRC1
*	PRDM1	*	HSP90AA1		GSN		AREG
*	SCYL1	*	KIF1C	*	SNORA31	*	SNRPD1
*	NPC1	*	CERK	*	CST3	*	SLC7A11
*	C6orf106	*	ATP6V1A	*	HNRNPUL1		CLEC10A
*	USP17L5	*	PQLC1	*	PDIA6	*	CPVL
*	BNIP3L	*	CACUL1	*	ALDH2	*	SNX8
*	EAH1		PRKCD	*	PIIB	*	ATP2A2
*	MIR54811	*	STK10	*	TUBA1B		CCL17
*	JUP	*	IER3	*	SEC61G		
*	PEBP1		HECA	*	ATP5J2		
	HMOX1	*	DDIT4		HLA-DPB1		
*	CTSB		TOLLIP	*	RCC2		
*	SQSTM1	*	CHP1	*	AIM1		
*	VAT1	*	LAMTOR3	*	DNAJB11		
*	CYBASC3		KLF4		CSF1R		

10

20

30

40

50

【請求項 10】

前記 7 種の遺伝子群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子の他に、下記の 25 種の遺伝子群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルが測定される、請求項 9 記載の方法、

ABHD8、GPT2、PLIN2、FAM100B、YPEL2、MAP1LC3B

2、RLF、KIAA0930、UBE2R2、HK2、USF2、PDIA3P、HNRNPUL1、SEC61G、DNAJB11、SDHD、NDUFS7、ECH1、CASS4、IL7R、CLEC4A、AREG、SNRPD1、SLC7A11及びSNX8。

【請求項11】

前記遺伝子又はそれに由来する核酸と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、又は前記遺伝子の発現産物を認識する抗体を含有する、請求項1～10のいずれか1項記の方法に用いられる乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するための検査用キット。

【請求項12】

下表B-1～B-2に示される383種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物からなる、乳幼児アトピー性皮膚炎の検出マーカー。

【表 B - 1】

AGR2	H1FO	LY6G6C	KDSR	TBC1D17	LOC100093631
SPNS2	RARG	ATP6V1C2	PPDPF	SH3D21	MAP1LC3A
DNASE1L2	KRTAP4-9	LYPD5	LYPLA1	MPZL3	PRDM1
MEST	SULT2B1	BMP2	SDCBP2	EPB41	SCYL1
HES4	WIP1	HIP1R	ADIPOR2	UBAP1	NPC1
FAM108C1	RUSC2	S100A16	SSFA2	LRP10	C6orf106
KRT79	SMOX	C1orf21	ISG15	PAPL	USP17L5
ARL5A	GCH1	KLHL21	GTPBP2	RALGDS	BNIP3L
ALDH3B2	MAPK13	GAS7	DDHD1	TRIM29	EBF1
CALML3	MYZAP	LCE1F	GALNT1	ADIPOR1	MIR54811
PLCD3	HS3ST6	PARD6B	CRK	LCE2A	JUP
OXR1	KRTAP12-1	TM4SF1	TMEM86A	BASP1	PEBP1
UNC5B	CIDEA	FOXO3	HSPA1B	RASAL1	CTSB
HSBP1L1	DSP	GDE1	PTK6	GIPC1	SQSTM1
MARCH3	C15orf62	SH3BP5L	DUSP16	CLTB	VAT1
CRAT	DHCR24	MAL2	FCHSD1	UBIAD1	CYBASC3
PLB1	KRT34	SLC31A1	SNX18	BPGM	EIF4EBP2
CDC34	ZDHHC9	BNIP3	RASA4CP	LPCAT1	ATG2A
FAM84B	GNG12	PLA2G4E	CPEB4	RANGAP1	RAD23B
TSPAN6	CTNNBIP1	SLAMF7	RAB27A	PRSS22	DSTN
KRTAP5-5	FAM193B	C2orf54	AKTIP	CTSD	TPRA1
SEPT5	ID1	PIK3AP1	RGP1	HIST3H2A	BICD2
MSMO1	KRT86	ATMIN	MIEN1	SMS	RNF11
RRAD	KRTAP3-1	KIAA0513	VKORC1L1	TBC1D20	ULK1
CHAC1	LCE2D	GDPD3	ABTB2	SERINC2	SYTL1
SLC40A1	THRSP	KRT80	AATK	KCTD20	MGLL
NIPAL2	NR1D1	EPHX3	TUFT1	FAM188A	WBP2
SPTLC3	IRGQ	LCE2C	MEA	ASS1	NUDT4
EPN3	CYB5R1	DNAJB1	HDAC7	ZNF664	PIM1
KLHDC3	FAM222B	NEDD4L	PHLDA2	PPP2CB	SYPL1
RNF217	DHCR7	IRAK2	TMED3	GOLGA4	OTUD5
NTAN1	FBXO32	KCTD11	PRR24	ZRANB1	IRAK1
CDKN2B	CARD18	KRT8	HIST1H2BK	TSPAN14	UPK3BL
MARCKS	MGST1	SMPD3	SURF1	NEU1	PTK2B
RMND5B	TEX264	RSC1A1	DUSP14	OSBPL2	MAPK3
NCCRP1	LCE1C	PLD3	FAM214A	RNF103	KRT23
GBA2	STARD5	HN1L	FAM102A	FEM1B	UBXN6
SPAG1	TMEM189	PGRMC2	DNAJC5	RANBP9	ATP6VOC
ZFAND6	SNORA31	SEC61G	SEC24D	STK17B	H2AFY
SIAH2	CST3	DNAJB11	ARHGDIB	HNRNPA1	GNB2L1
NBR1	PDIA6	SDHD	C10orf128	TAGLN2	EIF3K
ZFAND5	ALDH2	NDUFS7	TXN2	TNIP1	DBI
HSP90AA1	PPIB	ECH1	YWHAG	SIRPA	SH3BGR13
KIF1C	TUBA1B	CASS4	LAMTOR4	GLRX	NDUFB11
CERK	ATP5J2	CLEC4A	CRCP	NOTCH2NL	YWHAH
ATP6V1A	RCC2	SNRPD1	STT3A	SLK	TMX2
PQLC1	AIM1	SLC7A11	CRISPLD2	ZFP36L2	HLA-DOA
CACUL1	SYNGR2	SNX8	DEFB4B	RAB21	CIITA
STK10	TGFB1	IMPDH2	CD93	EIF5	ADAM19
IER3	DDOST	ERI1	PLIN3	PRELID1	ANPEP
DDIT4	TUBA1A	FBXW2	USMG5	SQRDL	MAT2A
CHP1	CD52	MED14	LOC285359	SERP1	CPVL
LAMTOR3	HLA-DMA	HYOU1	SLC20A1	RAB7A	ATP2A2
KCNQ1OT1	CCND2	CTDSP1	MSL1	ARF1	ABHD8
CHMP5	S100A4	USP16	SLC11A2	NDUFA1	GPT2

10

20

30

40

【表 B - 2】

PLIN2	TXNDC17	CAPG
FAM100B	FBXW4	VKORC1
YPEL2	FBP1	ACSL4
MAP1LC3B2	ZNF91	CDC123
RLF	RBM17	SCARNA7
KIAA0930	PRPF38B	RNASET2
UBE2R2	ATP5H	C6orf62
HK2	BAX	SLC39A8
USF2	ALYREF	ARHGAP9
PDIA3P	PRMT1	TMEM214
HNRNPUL1	CTSC	AMICA1
KHDRBS1	CYTIP	
CORO1B	SNORA6	
ZFAND2A	U2AF1	
CDC42EP1	VPS13C	
CCM2	NBPF10	
RNF24	ZNF430	
SRPK2	SPEN	
LST1	CIB1	
INF2	TMEM33	
AMD1	NPEPPS	

10

20

【請求項 1 3】

I M P D H 2、E R I 1、F B X W 2、S T K 1 7 B、T A G L N 2、A M I C A 1 及び H N R N P A 1 からなる 7 種の遺伝子群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子又はその発現産物である、請求項 1 2 記載の乳幼児アトピー性皮膚炎の検出マーカー。

【請求項 1 4】

A B H D 8、G P T 2、P L I N 2、F A M 1 0 0 B、Y P E L 2、M A P 1 L C 3 B 2、R L F、K I A A 0 9 3 0、U B E 2 R 2、H K 2、U S F 2、P D I A 3 P、H N R N P U L 1、S E C 6 1 G、D N A J B 1 1、S D H D、N D U F S 7、E C H 1、C A S S 4、C L E C 4 A、S N R P D 1、S L C 7 A 1 1 及び S N X 8 からなる 2 3 種の遺伝子群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子又はその発現産物である、請求項 1 2 記載の乳幼児アトピー性皮膚炎の検出マーカー。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーを用いた乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アトピー性皮膚炎（以下、「AD」とも称する）は、アトピー素因を有する者に主に発症する湿疹性皮膚疾患である。アトピー性皮膚炎の典型的な症状は、左右対側性に発生する、慢性及び反復性の痒み、皮疹、紅斑等、ならびに角化不全、バリア能低下、乾燥肌などである。アトピー性皮膚炎の多くは乳幼児に発症し、成長と共に軽快傾向を示すが、近年では成人型や難治性のアトピー性皮膚炎も増加している。

40

【0003】

アレルギーやアトピーになりやすい遺伝的素因を持っている新生児／乳児は、乳児湿疹、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、さらには気管支喘息、アレルギー性鼻炎など年齢とともに様々なアレルギー疾患を発症すること（アレルギーマーチ）が知られている。このようにアレルギー疾患は、1つの疾患を発症すると別のアレルギー疾患に罹患する可能性が高くなり、その治療も長期にわたることが多いことから、乳幼児の段階でアレルギー疾患の発症を抑えることが必要とされている。

50

【0004】

バイオマーカーを用いてアトピー性皮膚炎を検出する方法として、血液の末梢血好酸球数、血清総IgE値、LDH（乳酸デヒドロゲナーゼ）値、血清中のThymus and Activation-Regulated Chemokine（TARC）やSquamous cell carcinoma antigen 2（SCCA2）を検出すること（非特許文献1、2、3）を検出することや、皮膚細菌叢における黄色ブドウ球菌のagrC変異依存性のRNAIII遺伝子発現量を検出すること（特許文献1）等が提案されている。

しかしながら、これらのマーカーが乳幼児のアトピー性皮膚炎にも適用可能かどうかは明らかではない。

10

【0005】

一方、生体試料中のDNAやRNA等の核酸の解析によりヒトの生体内の現在さらには将来の生理状態を調べる技術が開発されている。核酸を用いた解析は、網羅的な解析方法が確立されており一度の解析で豊富な情報を得られる、及び一塩基多形やRNA機能等に関する多くの研究報告に基づいて解析結果の機能的な紐付けが容易であるといった利点を有する。生体由来の核酸は、血液等の体液、分泌物、組織等から抽出することができるが、最近、皮膚表上脂質（skin surface lipids；SSL）に含まれるRNAを生体の解析用の試料として用いること、SSLから表皮、汗腺、毛包及び皮脂腺のマーカー遺伝子が検出できることが報告されている（特許文献2）。

【先行技術文献】

20

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2019-30272号公報

【特許文献2】国際公開公報第2018/008319号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Sugawara et al., Allergy (2002) 57:180-181

【非特許文献2】Ohta et al., Ann Clin Biochem.(2012) 49:277-84

【非特許文献3】加藤ら、日皮会誌（2018）128：2431-2502

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するためのマーカー、及び該マーカーを用いた乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法を提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、アトピー性皮膚炎を有する乳幼児とアレルギー素因のない健常皮膚の乳幼児からSSLを採取し、SSL中に含まれるRNAの発現状態をシーケンス情報として網羅的に解析した結果、特定の遺伝子の発現レベルが両者の間で有意に異なり、これを指標として乳幼児アトピー性皮膚炎を検出できることを見出した。

40

【0010】

すなわち、本発明は、以下の1)～3)に係るものである。

1) 被験者から採取された生体試料について、IMPDH2、ERI1、FBXW2、STK17B、TAGLN2、AMICA1及びHNRRNPA1からなる7種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルを測定する工程を含む、当該被験者における乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法。

2) 前記遺伝子と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、又は前記遺伝子の発現産物を認識する抗体を含有する、1)の方法に用いられる乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するための検査用キット。

3) 後記表B-1～B-2に示される遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子

50

又はその発現産物からなる、乳幼児アトピー性皮膚炎の検出マーカー。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、簡便且つ非侵襲的に、乳幼児アトピー性皮膚炎を早期に、高い精度、感度及び特異度で検出することが可能となる。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本明細書中で引用された全ての特許文献、非特許文献、及びその他の刊行物は、その全体が本明細書中において参考として援用される。

【0013】

本発明において、「核酸」又は「ポリヌクレオチド」と云う用語は、DNA又はRNAを意味する。DNAには、cDNA、ゲノムDNA、及び合成DNAのいずれもが含まれ、「RNA」には、total RNA、mRNA、rRNA、tRNA、non-coding RNA及び合成のRNAのいずれもが含まれる。

【0014】

本発明において「遺伝子」とは、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNAの他、cDNAを含む1本鎖DNA（正鎖）、当該正鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（相補鎖）、及びこれらの断片を包含するものであって、DNAを構成する塩基の配列情報の中に、何らかの生物学的情報が含まれているものを意味する。

また、当該「遺伝子」は特定の塩基配列で表される「遺伝子」だけではなく、これらの同族体（すなわち、ホモログもしくはオーソログ）、遺伝子多型等の変異体、及び誘導体をコードする核酸が包含される。

本明細書中に開示される遺伝子の名称は、NCBI（[www.ncbi.nlm.nih.gov/]）に記載のあるOfficial Symbolに従う。一方で遺伝子オントロジー（GO）に関しては、String（[string-db.org/]）に記載のあるPathway ID.に従う。

【0015】

本発明において、遺伝子の「発現産物」とは、遺伝子の転写産物及び翻訳産物を包含する概念である。「転写産物」とは、遺伝子（DNA）から転写されて生じるRNAであり、「翻訳産物」とは、RNAに基づき翻訳合成される、遺伝子にコードされたタンパク質を意味する。

【0016】

本発明において、「アトピー性皮膚炎」とは、増悪・寛解を繰り返す、そう痒のある湿疹を主病原とする疾患を指し、その患者の多くは、アトピー素因を持つとされている。アトピー素因としては、i) 家族歴・既往歴（気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎のうちいずれか、あるいは複数の疾患）、又はii) IgE抗体を産生しやすい素因が挙げられる。

本発明において、乳幼児アトピー性皮膚炎とは、0歳から学童に入るまでの年齢、具体的には0歳から5歳までの乳幼児を対象としている。皮疹は、乳児期は頭、顔にはじまりしばしば体幹、四肢に下降し、幼児期には、顔面の皮疹は減少し、頸部、四肢関節部を中心に出現するという特徴がある。乳幼児アトピー性皮膚炎と成人アトピー性皮膚炎の違いについては、近年、成人アトピー性皮膚炎が乳幼児アトピー性皮膚炎に比べて、慢性的な炎症異常に伴う表皮角化異常が認められることが報告されているが（journal of allergy and clinical immunology, volume 141, issue 6, June 2018, page 2094-2106）、報告数が少なく明確になっていない。

【0017】

本発明において、乳幼児アトピー性皮膚炎の「検出」とは、乳幼児アトピー性皮膚炎の存在又は不存在を明らかにする意味であり、検査、測定、判定、評価又は評価支援という用語で言い換えることもできる。なお、本明細書において「判定」又は「評価」という用語は、医師による判定や評価を含むものではない。

10

20

30

40

50

【0018】

本明細書において、「特徴量」とは機械学習における「説明変数」と同義であり、アトピー性皮膚炎検出マーカーから選択される機械学習に使用する遺伝子又はその発現産物を合わせて「特徴量遺伝子」と称する。

【0019】

後述する実施例に示すように、健常児28名／アトピー性皮膚炎罹患児25名のSSLから抽出されたRNAの発現量のデータ（リードカウント値）について、DESeq2（Love MI et al. Genome Biol. 2014）を用いて補正されたカウント値（Normalized count 値）を用いて、健常児と比較してアトピー性皮膚炎罹患児における尤度比検定によるp値の補正值（FDR）が0.25未満となるRNAを抽出することにより、発現上昇遺伝子61種、発現低下遺伝子310種（計371遺伝子（表1-1～1-9）が同定された。表中、「UP」で示される遺伝子は、アトピー性皮膚炎罹患児で発現レベルが上がる遺伝子であり、「DOWN」で示される遺伝子は、アトピー性皮膚炎罹患児で発現レベルが下がる遺伝子である。

10

したがって、斯かる371種の遺伝子群より選択される遺伝子又はその発現産物は、乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するための乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーとなり得る。当該遺伝子群のうち318遺伝子（表1-1～1-9において＊を付し太字で表示）は、これまでにアトピー性皮膚炎との関係が報告されていない遺伝子である。

【0020】

また、被験者から検出された全てのSSL由来RNAの発現量のデータ（3486遺伝子の $\log_2$ （RPM+1）値）を説明変数とし、健常者と乳幼児アトピー性皮膚炎患者を目的変数とし、機械学習アルゴリズムとしてランダムフォレスト（Breiman L. Machine Learning (2001) 45;5-32）を用いて特徴量遺伝子の抽出及び予測モデルの構築を試みた。後述する実施例に示すように、ジニ係数に基づく変数重要度の上位100遺伝子（表3-1～3-3）を特徴量遺伝子として選択し、これを用いたモデルで乳幼児アトピー性皮膚炎の予測が可能であることが示された。

20

したがって、斯かる100種の遺伝子群より選択される遺伝子又はその発現産物は、乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するための好適な乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーとなり得る。当該遺伝子群のうち92遺伝子（表3-1～3-3において＊を付し太字で表示）は、これまでにアトピー性皮膚炎との関係が報告されていない遺伝子であり、新規な乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーである。後述する実施例に示すように、これら新規の乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーを用いた予測モデルでも乳幼児アトピー性皮膚炎の予測が可能である。

30

【0021】

また、健常児とアトピー性皮膚炎罹患児で発現変動が見られた上記の371遺伝子又はそのうちの318遺伝子の発現量のデータ（ $\log_2$ （RPM+1）値）を用いて、同様にランダムフォレストを用いて予測モデルの構築を試みたところ、いずれにおいても乳幼児アトピー性皮膚炎の予測が可能であることが示された

【0022】

また、機械学習アルゴリズムとしてBoruta法（Kursa et al. Fundamental Informaticae (2010) 101;271-286）を用いて特徴量遺伝子の抽出（最大試行回数1000回、p値0.01未満）を行ったところ、9種の遺伝子（表4）が特徴量遺伝子として抽出され、後述の実施例で示すように、これを用いたランダムフォレストによる予測モデルで乳幼児アトピー性皮膚炎の予測が可能であることが示された。

40

したがって、斯かる9種の遺伝子群より選択される遺伝子又はその発現産物は、乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するための乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーとなり得る。当該遺伝子群のうち7遺伝子（表4において＊を付し太字で表示）は、これまでにアトピー性皮膚炎との関係が全く報告されていない遺伝子であり、新規な乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーである。後述する実施例に示すように、これら新規の乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーを用いた予測モデルでも乳幼児アトピー性皮膚炎の予測が可能である。

50

【0023】

上述した発現変動解析で抽出された表1-1～1-9で示される371種の遺伝子群（A）と、ランダムフォレストにより特徴量遺伝子として選択された表3-1～3-3で示される100種の遺伝子群（B）及びB o r u t a法により特徴量遺伝子として選択された表4で示される9種の遺伝子群（C）の和（ $A \cup B \cup C$ ）である441種の遺伝子（表A-1～A-2）はいずれも乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーなり得、このうち383種（表B-1～B-2）は新規な乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーである。

【0024】

【表 A - 1】

DEFB1	RNF217	LCE2D	BNIP3	HSPA1B	TRIM29
AGR2	CA6	THRSP	PLA2G4E	PTK6	DGAT2
GAL	NTAN1	NR1D1	SLAMF7	DUSP16	ADIPOR1
CLU	CDKN2B	IRGQ	LCN2	SLPI	LCE2A
SPNS2	MARCKS	CYB5R1	C2orf54	FCHSD1	BASP1
HLA-A	RMND5B	FAM222B	PIK3AP1	SNX18	RASAL1
DNASE1L2	NCCRP1	DHCR7	ATMIN	RASA4CP	GIPC1
MEST	SLC15A1	CCL3	KIAA0513	CPEB4	CLTB
HES4	GBA2	FBXO32	GDPD3	RAB27A	UBIAD1
FAM108C1	SPAG1	CDSN	FAR2	AKTIP	BPGM
KRT79	KRT17	CARD18	KRT80	RGP1	LPCAT1
ARL5A	H1FO	MGST1	EPHX3	MIEN1	RANGAP1
ALDH3B2	RARG	WASL	LCE2C	SCD	PRSS22
CALML3	KLK11	TEX264	DNAJB1	VKORC1L1	CTSD
PLCD3	KRTAP4-9	LCE1C	NEDD4L	ABTB2	HIST3H2A
OXR1	SULT2B1	KLK13	POR	AATK	SMS
UNC5B	WIPI2	INPPL1	IRAK2	TUFT1	LGALS3
HSBP1L1	RUSC2	SORT1	KCTD11	MEA	TBC1D20
MARCH3	SMOX	STARD5	KRT8	HDAC7	SERINC2
ASPRV1	GCH1	TMEM189	SMPD3	PHLDA2	KCTD20
CRAT	MAPK13	A2M	CD48	TMED3	FAM188A
DMKN	MYZAP	LY6G6C	RSC1A1	PRR24	ASS1
PLB1	HS3ST6	ATP6V1C2	PLD3	SBSN	ZNF664
CDC34	KRTAP12-1	LYPD5	HN1L	HIST1H2BK	PPP2CB
FAM84B	PSORS1C2	BMP2	PGRMC2	SURF1	GOLGA4
CTSA	CIDEA	HIP1R	KDSR	DUSP14	ZRANB1
TSPAN6	DSP	S100A16	PPDPF	FAM214A	EHF
KRTAP5-5	C15orf62	C1orf21	LYPLA1	FAM102A	TSPAN14
SEPT5	DHCR24	KLHL21	SDCBP2	DNAJC5	KEAP1
MSMO1	KRT34	GAS7	ADIPOR2	TBC1D17	ABHD5
RRAD	PCDH1	LCE1F	SSFA2	SH3D21	NEU1
CHAC1	ZDHHC9	PARD6B	BCL2L1	MPZL3	OSBPL2
SLC40A1	GNG12	TM4SF1	ISG15	EPB41	RNF103
NIPAL2	CTNNBIP1	FOXO3	GTPBP2	UBAP1	FEM1B
SPTLC3	FAM193B	GDE1	DDHD1	LRP10	RANBP9
EPN3	ID1	SH3BP5L	GALNT1	PAPL	LOC100093631
KLK6	KRT86	MAL2	CRK	RALGDS	MAP1LC3A
KLHDC3	KRTAP3-1	SLC31A1	TMEM86A	SHB	PRDM1
SCYL1	NBR1	DBI	GPT2	PRPF38B	CDC42EP1
NPC1	ZFAND5	SH3BGRL3	PLIN2	ATP5H	CCM2
C6orf106	HSP90AA1	NDUFB11	FAM100B	BAX	RNF24
USP17L5	KIF1C	YWHAH	YPEL2	ALYREF	SRPK2
BNIP3L	CERK	CALR	MAP1LC3B2	PRMT1	LST1
EAF1	ATP6V1A	GSN	RLF	CTSC	INF2
MIR5481I	PQLC1	SNORA31	KIAA0930	CYTIP	AMD1
JUP	CACUL1	CST3	UBE2R2	SNORA6	ITGAM
PEBP1	PRKCD	PDIA6	HK2	U2AF1	CAPG
HMOX1	STK10	ALDH2	USF2	VPS13C	VKORC1
CTSB	IER3	PIIB	PDIA3P	NBPF10	ACSL4
SQSTM1	HECA	TUBA1B	HNRNPUL1	ZNF430	CDC123
VAT1	DDIT4	ATP5J2	SEC61G	SPEN	SCARNA7
CYBASC3	TOLLIP	HLA-DPB1	DNAJB11	CIB1	RNASET2
EIF4EBP2	CHP1	RCC2	SDHD	TMEM33	C6orf62
ATG2A	LAMTOR3	AIM1	NDUF57	NPEPPS	SLC39A8
RAD23B	KLF4	CSF1R	ECH1	SEC24D	ARHGAP9

【 0 0 2 5 】

【表 A - 2】

DSTN	KCNQ10T1	SYNGR2	CASS4	ARHGDIB	SCAP
TPRA1	CAST	TGFBI	IL7R	C10orf128	TMEM214
BICD2	CHMP5	DDOST	CLEC4A	TXN2	AMICA1
RNF11	TNIP1	TUBA1A	AREG	CISH	STK17B
ULK1	SIRPA	LGALS1	SNRPD1	YWHAG	HNRNPA1
SYTL1	GLRX	CD52	SLC7A11	LAMTOR4	TAGLN2
MGLL	NOTCH2NL	HLA-DMA	SNX8	CRCP	
WBP2	SLK	CCND2	IMPDH2	STT3A	
NUDT4	ZFP36L2	S100A4	ERI1	CRISPLD2	
PIM1	RAB21	TMX2	FBXW2	DEFB4B	
SYPL1	EIF5	HLA-DOA	PYCARD	CD93	
OTUD5	PRELID1	MMP12	CCL17	PLIN3	
IRAK1	SQRDL	CIITA	MED14	USMG5	
UPK3BL	SERP1	ADAM19	HYOU1	LOC285359	
PTK2B	RAB7A	ANPEP	CTDSP1	SLC20A1	
MAPK3	ARF1	MAT2A	USP16	MSL1	
KRT23	NDUFA1	MRC1	TXNDC17	SLC11A2	
UBXN6	ENO1	CLEC10A	FBXW4	KHDRBS1	
ATP6VOC	H2AFY	CPVL	FBP1	CORO1B	
ZFAND6	GNB2L1	ATP2A2	ZNF91	ZFAND2A	
SIAH2	EIF3K	ABHD8	RBM17	DOK2	

【 0 0 2 6 】

10

20

【表 B - 1】

AGR2	H1F0	LY6G6C	KDSR	TBC1D17	LOC100093631
SPNS2	RARG	ATP6V1C2	PPDPF	SH3D21	MAP1LC3A
DNASE1L2	KRTAP4-9	LYPD5	LYPLA1	MPZL3	PRDM1
MEST	SULT2B1	BMP2	SDCBP2	EPB41	SCYL1
HES4	WIP12	HIP1R	ADIPOR2	UBAP1	NPC1
FAM108C1	RUSC2	S100A16	SSFA2	LRP10	C6orf106
KRT79	SMOX	C1orf21	ISG15	PAPL	USP17L5
ARL5A	GCH1	KLHL21	GTPBP2	RALGDS	BNIP3L
ALDH3B2	MAPK13	GAS7	DDHD1	TRIM29	EF1
CALML3	MYZAP	LCE1F	GALNT1	ADIPOR1	MIR548I1
PLCD3	HS3ST6	PARD6B	CRK	LCE2A	JUP
OXR1	KRTAP12-1	TM4SF1	TMEM86A	BASP1	PEBP1
UNC5B	CIDEA	FOXO3	HSPA1B	RASAL1	CTSB
HSBP1L1	DSP	GDE1	PTK6	GIPC1	SQSTM1
MARCH3	C15orf62	SH3BP5L	DUSP16	CLTB	VAT1
CRAT	DHCR24	MAL2	FCHSD1	UBIAD1	CYBASC3
PLB1	KRT34	SLC31A1	SNX18	BPGM	EIF4EBP2
CDC34	ZDHC9	BNIP3	RASA4CP	LPCAT1	ATG2A
FAM84B	GNG12	PLA2G4E	CPEB4	RANGAP1	RAD23B
TSPAN6	CTNNBIP1	SLAMF7	RAB27A	PRSS22	DSTN
KRTAP5-5	FAM193B	C2orf54	AKTIP	CTSD	TPRA1
SEPT5	ID1	PIK3AP1	RGP1	HIST3H2A	BICD2
MSMO1	KRT86	ATMIN	MIEN1	SMS	RNF11
RRAD	KRTAP3-1	KIAA0513	VKORC1L1	TBC1D20	ULK1
CHAC1	LCE2D	GDPD3	ABTB2	SERINC2	SYTL1
SLC40A1	THRSP	KRT80	AATK	KCTD20	MGLL
NIPAL2	NR1D1	EPHX3	TUFT1	FAM188A	WBP2
SPTLC3	IRGQ	LCE2C	MEA	ASS1	NUDT4
EPN3	CYB5R1	DNAJB1	HDAC7	ZNF664	PIM1
KLHDC3	FAM222B	NEDD4L	PHLDA2	PPP2CB	SYPL1
RNF217	DHCR7	IRAK2	TMED3	GOLGA4	OTUD5
NTAN1	FBXO32	KCTD11	PRR24	ZRANB1	IRAK1
CDKN2B	CARD18	KRT8	HIST1H2BK	TSPAN14	UPK3BL
MARCKS	MGST1	SMPD3	SURF1	NEU1	PTK2B
RMND5B	TEX264	RSC1A1	DUSP14	OSBPL2	MAPK3
NCCRP1	LCE1C	PLD3	FAM214A	RNF103	KRT23
GBA2	STARD5	HN1L	FAM102A	FEM1B	UBXN6
SPAG1	TMEM189	PGRMC2	DNAJC5	RANBP9	ATP6VOC
ZFAND6	SNORA31	SEC61G	SEC24D	STK17B	H2AFY
SIAH2	CST3	DNAJB11	ARHGDIB	HNRNPA1	GNB2L1
NBR1	PDIA6	SDHD	C10orf128	TAGLN2	EIF3K
ZFAND5	ALDH2	NDUFS7	TXN2	TNIP1	DBI
HSP90AA1	PPIB	ECH1	YWHAG	SIRPA	SH3BGRL3
KIF1C	TUBA1B	CASS4	LAMTOR4	GLRX	NDUFB11
CERK	ATP5J2	CLEC4A	CRCP	NOTCH2NL	YWHAH
ATP6V1A	RCC2	SNRPD1	STT3A	SLK	TMX2
PQLC1	AIM1	SLC7A11	CRISPLD2	ZFP36L2	HLA-DOA
CACUL1	SYNGR2	SNX8	DEFB4B	RAB21	CIITA
STK10	TGFBI	IMPDH2	CD93	EIF5	ADAM19
IER3	DDOST	ERI1	PLIN3	PRELID1	ANPEP
DDIT4	TUBA1A	FBXW2	USMG5	SQRDL	MAT2A
CHP1	CD52	MED14	LOC285359	SERP1	CPVL
LAMTOR3	HLA-DMA	HYOU1	SLC20A1	RAB7A	ATP2A2
KCNQ10T1	CCND2	CTDSP1	MSL1	ARF1	ABHD8
CHMP5	S100A4	USP16	SLC11A2	NDUFA1	GPT2

【 0 0 2 7 】

【表 B - 2】

PLIN2	TXNDC17	CAPG
FAM100B	FBXW4	VKORC1
YPEL2	FBP1	ACSL4
MAP1LC3B2	ZNF91	CDC123
RLF	RBM17	SCARNA7
KIAA0930	PRPF38B	RNASET2
UBE2R2	ATP5H	C6orf62
HK2	BAX	SLC39A8
USF2	ALYREF	ARHGAP9
PDIA3P	PRMT1	TMEM214
HNRNPUL1	CTSC	AMICA1
KHDRBS1	CYTIP	
CORO1B	SNORA6	
ZFAND2A	U2AF1	
CDC42EP1	VPS13C	
CCM2	NBPF10	
RNF24	ZNF430	
SRPK2	SPEN	
LST1	CIB1	
INF2	TMEM33	
AMD1	NPEPPS	

10

【0028】

20

本発明の IMPDH2、ERI1、FBXW2、STK17B、TAGLN2、AMICA1 及び HNRNPA1 からなる 7 種の遺伝子は、上述したランダムフォレストにより特徴量遺伝子として選択された表 3-1～3-3 に記載の 100 種の遺伝子群 (B) と、Boruta 法により特徴量遺伝子として選択された表 4 に記載の 9 種の遺伝子群 (C) に共通する遺伝子 ($B \cap C$) であって、従来アトピー性皮膚炎との関係が全く報告されていない遺伝子である (各表中、* を付し太字で表示)。したがって、これらの遺伝子群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子又はその発現産物は、乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するための、新規な乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーとして特に有用である。

さらに、このうち、IMPDH2、ERI1 及び FBXW2 は、上述した発現変動解析で抽出された表 1-1～1-9 に記載の 371 種の遺伝子群 (A) にも含まれる遺伝子 ($A \cap B \cap C$) であることから、より好ましい新規な乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーと云える。

30

斯かる 7 種の遺伝子はそれぞれ単独で乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーとなり得るが、2 種以上、好ましくは 4 種以上、より好ましくは 6 種以上を組み合わせる用いることが好ましく、7 種全てを用いるのがよりさらに好ましい。

【0029】

また、本発明の ABHD8、GPT2、PLIN2、FAM100B、YPEL2、MAP1LC3B2、RLF、KIAA0930、UBE2R2、HK2、USF2、PDIA3P、HNRNPUL1、SEC61G、DNAJB11、SDHD、NDUFS7、ECH1、CASS4、CLEC4A、SNRPD1、SLC7A11 及び SNX8 からなる 23 種の遺伝子は、上述した発現変動解析で抽出された表 1-1～1-9 に記載の 371 種の遺伝子群 (A) と、ランダムフォレストにより特徴量遺伝子として選択された表 3-1～3-3 に記載の 100 種の遺伝子群 (B) の共通部分に含まれ、従来アトピー性皮膚炎との関係が全く報告されていない遺伝子から、前記の IMPDH2、ERI1 及び FBXW2 を除いた遺伝子である。したがって、これらの遺伝子群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子又はその発現産物もまた、乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するための、新規な乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーとして有用である。

40

【0030】

なお、上記の乳幼児アトピー性皮膚炎マーカーとなり得る遺伝子 (以下、「標的遺伝子」とも称す) には、乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するためのバイオマーカーとなり得る

50

限り、当該遺伝子を構成するDNAの塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有する遺伝子も包含される。ここで、実質的に同一の塩基配列とは、例えば、相同性計算アルゴリズムNCBI BLASTを用い、期待値＝10；ギャップを許す；フィルタリング＝ON；マッチスコア＝1；ミスマッチスコア＝－3の条件にて検索をした場合、当該遺伝子を構成するDNAの塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、さらにより好ましく98%以上の同一性があることを意味する。

【0031】

本発明の乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法は、被験者から採取された生体試料について、標的遺伝子、一態様として、IMPDH2、ERI1、FBXW2、STK17B、TAGLN2、AMICA1及びHNRNPA1からなる7種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルを測定する工程を含む。

10

【0032】

本発明において用いられる生体試料としては、アトピー性皮膚炎の発症、進行に伴い本発明の遺伝子が発現変化する組織及び生体材料であればよい。具体的には臓器、皮膚、血液、尿、唾液、汗、皮膚表上脂質（SSL）、組織浸出液等の体液、血液から調製された血清、血漿、その他、便、毛髪等が挙げられ、好ましくは皮膚または皮膚表上脂質（SSL）、より好ましくは皮膚表上脂質（SSL）が挙げられる。

また、生体試料を採取する被験体は、乳幼児であれば性別や人種など特に限定されないが、アトピー性皮膚炎の検出を必要とする乳幼児又はアトピー性皮膚炎の発症が疑われる乳幼児が好ましい。

20

【0033】

ここで、「皮膚表上脂質（SSL）」とは、皮膚の表上に存在する脂溶性画分をいい、皮脂と呼ばれることもある。一般に、SSLは、皮膚にある皮脂腺等の外分泌腺から分泌された分泌物を主に含み、皮膚表面を覆う薄い層の形で皮膚表上に存在している。SSLは、皮膚細胞で発現したRNAを含む。（前記特許文献3参照）。また本明細書において、「皮膚」とは、特に限定しない限り、体表の表皮、真皮、毛包、ならびに汗腺、皮脂腺及びその他の腺等の組織を含む領域の総称である。

【0034】

被験者の皮膚からのSSLの採取には、皮膚からのSSLの回収又は除去に用いられているあらゆる手段を採用することができる。好ましくは、後述するSSL吸収性素材、SSL接着性素材、又は皮膚からSSLをこすり落とす器具を使用することができる。SSL吸収性素材又はSSL接着性素材としては、SSLに親和性を有する素材であれば特に限定されず、例えばポリプロピレン、パルプ等が挙げられる。皮膚からのSSLの採取手順のより詳細な例としては、あぶら取り紙、あぶら取りフィルム等のシート状素材へSSLを吸収させる方法、ガラス板、テープ等へSSLを接着させる方法、スパーテル、スクレイパー等によりSSLをこすり落として回収する方法、等が挙げられる。SSLの吸着性を向上させるため、脂溶性の高い溶媒を予め含ませたSSL吸収性素材を用いてもよい。一方、SSL吸収性素材は、水溶性の高い溶媒や水分を含んでいるとSSLの吸着が阻害されるため、水溶性の高い溶媒や水分の含有量が少ないことが好ましい。SSL吸収性素材は、乾燥した状態で用いることが好ましい。SSLが採取される皮膚の部位としては、特に限定されず、頭、顔、首、体幹、手足等の身体の任意の部位の皮膚が挙げられ、皮脂の分泌が多い部位、例えば顔の皮膚が好ましい。

30

40

【0035】

被験者から採取されたRNA含有SSLは一定期間保存されてもよい。採取されたSSLは、含有するRNAの分解を極力抑えるために、採取後できるだけ速やかに低温条件で保存することが好ましい。本発明における該RNA含有SSLの保存の温度条件は、0℃以下であればよく、好ましくは $-20 \pm 20^{\circ}\text{C}$ ～ $-80 \pm 20^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ ～ $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは $-20 \pm 20^{\circ}\text{C}$ ～ $-40 \pm 20^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ ～ $-40 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ である。該RNA含有SSLの該低温条件での保存の期間は、特

50

に限定されないが、好ましくは12か月以下、例えば6時間以上12ヶ月以下、より好ましくは6ヶ月以下、例えば1日間以上6ヶ月以下、さらに好ましくは3ヶ月以下、例えば3日間以上3ヶ月以下である。

【0036】

本発明において、標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定対象としては、RNAから人工的に合成されたcDNA、そのRNAをエンコードするDNA、そのRNAにコードされるタンパク質、該タンパク質と相互作用をする分子、そのRNAと相互作用する分子、又はそのDNAと相互作用する分子等が挙げられる。ここで、RNA、DNA又はタンパク質と相互作用する分子としては、DNA、RNA、タンパク質、多糖、オリゴ糖、単糖、脂質、脂肪酸、及びこれらのリン酸化物、アルキル化物、糖付加物等、及び上

10

【0037】

本発明の方法においては、好ましい態様として、生体試料としてSSLが用いられるが、この場合にはSSLに含まれるRNAの発現レベルが解析され、具体的にはRNAを逆転写によりcDNAに変換した後、該cDNA又はその増幅産物が測定される。

SSLからのRNAの抽出には、生体試料からのRNAの抽出又は精製に通常使用される方法、例えば、フェノール/クロロホルム法、AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法、又はTRIzol (登録商標)、RNeasy (登録商標)、QIAzol (登録商標) 等のカラムを用いた方法、シリカをコーティングした特殊な磁性体粒子を用いる方法、Solid Phase Reversible Immobilization 磁性体粒子を用いる方法、ISOGEN等の市販のRNA抽出試薬による抽出等を用いることができる。

20

【0038】

該逆転写には、解析したい特定のRNAを標的としたプライマーを用いてもよいが、より包括的な核酸の保存及び解析のためにはランダムプライマーを用いることが好ましい。該逆転写には、一般的な逆転写酵素又は逆転写試薬キットを使用することができる。好適には、正確性及び効率性の高い逆転写酵素又は逆転写試薬キットが用いられ、その例としては、M-MLV Reverse Transcriptase 及びその改変体、あるいは市販の逆転写酵素又は逆転写試薬キット、例えばPrimeScript (登録商標) Reverse Transcriptase シリーズ (タカラバイオ社)、SuperScript (登録商標) Reverse Transcriptase シリーズ (Thermo Scientific 社) 等が挙げられる。SuperScript (登録商標) III Reverse Transcriptase、SuperScript (登録商標) VILO cDNA Synthesis kit (いずれもThermo Scientific 社) 等が好ましく用いられる。

30

該逆転写における伸長反応は、温度を好ましくは42℃±1℃、より好ましくは42℃±0.5℃、さらに好ましくは42℃±0.25℃に調整し、一方、反応時間を好ましくは60分間以上、より好ましくは80～120分間に調整するのが好ましい。

40

【0039】

発現レベルを測定する方法は、RNA、cDNA又はDNAを対象とする場合、これらにハイブリダイズするDNAをプライマーとしたPCR法、リアルタイムRT-PCR法、マルチプレックスPCR、Smart Amp 法、LAMP法等に代表される核酸増幅法、これらにハイブリダイズする核酸をプローブとして用いるハイブリダイゼーション法 (DNAチップ、DNAマイクロアレイ、ドットプロットハイブリダイゼーション、スロットプロットハイブリダイゼーション、ノーザンプロットハイブリダイゼーション等)、塩基配列を決定する方法 (シーケンシング)、又はこれらを組み合わせた方法から選ぶことができる。

【0040】

50

PCRでは、解析したい特定のDNAを標的としたプライマーペアを用いて該特定の1種のDNAのみを増幅してもよいが、複数のプライマーペアを用いて同時に複数の特定のDNAを増幅してもよい。好ましくは、該PCRはマルチプレックスPCRである。マルチプレックスPCRは、PCR反応系に複数のプライマー対を同時に使用することで、複数の遺伝子領域を同時に増幅する方法である。マルチプレックスPCRは、市販のキット（例えば、Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit；ライフテクノロジーズジャパン株式会社等）を用いて実施することができる。

該PCRにおけるアニーリング及び伸長反応の温度は、使用するプライマーに依存するため一概には言えないが、上記のマルチプレックスPCRキットは用いる場合、好ましくは $62^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $62^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは $62^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$ である。したがって、該PCRでは、好ましくはアニーリング及び伸長反応が1ステップで行われる。該アニーリング及び伸長反応のステップの時間は、増幅すべきDNAのサイズ等に依存して調整され得るが、好ましくは14～18分間である。該PCRにおける変性反応の条件は、増幅すべきDNAに依存して調整され得るが、好ましくは $95 \sim 99^{\circ}\text{C}$ で10～60秒間である。上記のような温度及び時間での逆転写及びPCRは、一般的にPCRに使用されるサーマルサイクラーを用いて実行することができる。

【0041】

当該PCRで得られた反応産物の精製は、反応産物のサイズ分離によって行われることが好ましい。サイズ分離により、目的のPCR反応産物を、PCR反応液中に含まれるプライマーやその他の不純物から分離することができる。DNAのサイズ分離は、例えば、サイズ分離カラムや、サイズ分離チップ、サイズ分離に利用可能な磁気ビーズ等によって行うことができる。サイズ分離に利用可能な磁気ビーズの好ましい例としては、Ampure XP等のSolid Phase Reversible Immobilization (SPRI) 磁性ビーズが挙げられる。

【0042】

精製したPCR反応産物に対して、その後の定量解析を行うために必要なさらなる処理を施してもよい。例えば、DNAのシーケンシングのために、精製したPCR反応産物を、適切なバッファー溶液へと調製したり、PCR増幅されたDNAに含まれるPCRプライマー領域を切断したり、増幅されたDNAにアダプター配列をさらに付加したりしてもよい。例えば、精製したPCR反応産物をバッファー溶液へと調製し、増幅DNAに対してPCRプライマー配列の除去及びアダプターライゲーションを行い、得られた反応産物を、必要に応じて増幅して、定量解析のためのライブラリーを調製することができる。これらの操作は、例えば、SuperScript（登録商標）VILIO cDNA Synthesis kit（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）に付属している $5 \times$ VILIO RT Reaction Mix、及びIon AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）に付属している $5 \times$ Ion AmpliSeq HiFi Mix、及びIon AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Core Panelを用いて、各キット付属のプロトコルに従って行うことができる。

【0043】

ノーザンブロットハイブリダイゼーション法を利用して標的遺伝子又はそれに由来する核酸の発現量を測定する場合は、例えば、まずプローブDNAを放射性同位元素、蛍光物質等で標識し、次いで、得られた標識DNAを、常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーした生体試料由来のRNAとハイブリダイズさせる。その後、形成された標識DNAとRNAとの二重鎖を、標識物に由来するシグナルを検出することにより測定する方法が挙げられる。

【0044】

RT-PCR法を用いて標的遺伝子又はそれに由来する核酸の発現量を測定する場合は

、例えば、まず生体試料由来のRNAから常法に従ってcDNAを調製し、これを鋳型として本発明の標的遺伝子が増幅できるように調製した一对のプライマー（上記cDNA（一鎖）に結合する正鎖、+鎖に結合する逆鎖）をこれとハイブリダイズさせる。その後、常法に従ってPCR法を行い、得られた増幅二本鎖DNAを検出する。増幅された二本鎖DNAの検出には、予めRI、蛍光物質等で標識しておいたプライマーを用いて上記PCRを行うことによって産生される標識二本鎖DNAを検出する方法等を用いることができる。

【0045】

DNAマイクロアレイを用いて標的遺伝子又はそれに由来する核酸の発現量を測定する場合は、例えば、支持体に本発明の標的遺伝子由来の核酸（cDNA又はDNA）の少なくとも1種を固定化したアレイを用い、mRNAから調製した標識化cDNA又はcRNAをマイクロアレイ上に結合させ、マイクロアレイ上の標識を検出することによって、mRNAの発現量を測定することができる。

前記アレイに固定化される核酸としては、ストリンジェントな条件下に特異的（すなわち、実質的に目的の核酸のみに）にハイブリダイズする核酸であればよく、例えば、本発明の標的遺伝子の全配列を有する核酸であってもよく、部分配列からなる核酸であってもよい。ここで、「部分配列」とは、少なくとも15～25塩基からなる核酸が挙げられる。ここでストリンジェントな条件は、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の洗浄条件を挙げることができ、より厳しいハイブリダイズ条件としては「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件としては「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の条件を挙げることができる。ハイブリダイズ条件は、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Thrd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)等に記載されている。

【0046】

シーケンシングによって標的遺伝子又はそれに由来する核酸の発現量を測定する場合は、例えば、次世代シーケンサー（例えばIon S5/XLシステム、ライフテクノロジーズジャパン株式会社）が用いて解析することが挙げられる。シーケンシングで作成されたリードの数（リードカウント）に基づいて、RNA発現を定量することができる。

【0047】

上記の測定に用いられるプローブ又はプライマー、すなわち、本発明の標的遺伝子又はそれに由来する核酸を特異的に認識し増幅するためのプライマー、又は該RNA又はそれに由来する核酸を特異的に検出するためのプローブがこれに該当するが、これらは、当該標的遺伝子を構成する塩基配列に基づいて設計することができる。ここで「特異的に認識する」とは、例えばノーザンブロット法において、実質的に本発明の標的遺伝子又はそれに由来する核酸のみを検出できること、また例えばRT-PCR法において、実質的に当該核酸のみが増幅される如く、当該検出物又は生成物が当該遺伝子又はそれに由来する核酸であると判断できることを意味する。

具体的には、本発明の標的遺伝子を構成する塩基配列からなるDNA又はその相補鎖に相補的な一定数のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを利用することができる。ここで「相補鎖」とは、A:T（RNAの場合はU）、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、当該一定数の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の同一性を有すればよい。塩基配列の同一性は、前記BLAST等のアルゴリズムにより決定することができる。

斯かるオリゴヌクレオチドは、プライマーとして用いる場合には、特異的なアニーリング及び鎖伸長ができればよく、通常、例えば10塩基以上、好ましくは15塩基以上、より好ましくは20塩基以上、かつ例えば100塩基以下、好ましくは50塩基以下、より好ましくは35塩基以下の鎖長を有するものが挙げられる。また、プローブとして用いる場合には、特異的なハイブリダイゼーションができればよく、本発明の標的遺伝子を構成する塩基配列からなるDNA（又はその相補鎖）の少なくとも一部若しくは全部の配列を

有し、例えば10塩基以上、好ましくは15塩基以上、かつ例えば100塩基以下、好ましくは50塩基以下、より好ましくは25塩基以下の鎖長のものが用いられる。

なお、ここで、「オリゴヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができ、合成されたものでも天然のものでもよい。又はイブリダイゼーションに用いるプローブは、通常標識したものが用いられる。

【0048】

また、本発明の標的遺伝子の翻訳産物（タンパク質）、当該タンパク質と相互作用する分子、RNAと相互作用する分子、又はDNAと相互作用する分子を測定する場合は、プロテインチップ解析、免疫測定法（例えば、ELISA等）、質量分析（例えば、LC-MS/MS、MALDI-TOF/MS）、1-ハイブリッド法（PNAS 100, 12271-12276(2003)）や2-ハイブリッド法（Biol. Reprod. 58, 302-311 (1998)）のような方法を用いることができ、対象に応じて適宜選択できる。

例えば、測定対象としてタンパク質が用いられる場合は、本発明の発現産物に対する抗体を生体試料と接触させ、当該抗体に結合した試料中のタンパク質を検出し、そのレベルを測定することによって実施される。例えば、ウェスタンブロット法によれば、一次抗体として上記の抗体を用いた後、二次抗体として放射性同位元素、蛍光物質又は酵素等で標識した一次抗体に結合する抗体を用いて、その一次抗体を標識し、これら標識物質由来のシグナルを放射線測定器、蛍光検出器等で測定することが行われる。

尚、上記翻訳産物に対する抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。これらの抗体は、公知の方法に従って製造することができる。具体的には、ポリクローナル抗体は、常法に従って大腸菌等で発現し精製したタンパク質を用いて、あるいは常法に従って当該タンパク質の部分ポリペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。

一方、モノクローナル抗体は、常法に従って大腸菌等で発現し精製したタンパク質又は該タンパク質の部分ポリペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞から得ることができる。また、モノクローナル抗体は、ファージディスプレイを用いて作製してもよい（Griffiths, A.D.; Duncan, A.R., Current Opinion in Biotechnology, Volume 9, Number 1, February 1998, pp. 102-108(7)）。

【0049】

斯くして、被験者から採取された生体試料中の本発明の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルが測定され、当該発現レベルに基づいて乳幼児アトピー性皮膚炎が検出される。検出は、具体的には、測定された本発明の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを対照レベルと比較することによって行われる。

シーケンシングにより複数の標的遺伝子の発現レベルの解析を行う場合は、上記したように、発現量のデータであるリードカウント値、該リードカウント値をサンプル間の総リード数の違いを補正したRPM値、当該RPM値を底2の対数値に変換した値（ $\log_2$ RPM値）又は整数1を加算した底2の対数値（ $\log_2$ (RPM+1) 値）、あるいはDESeq2を用いて補正されたカウント値（Normalized count値）又は整数1を加算した底2の対数値（ $\log_2$ (count+1) 値）を指標として用いるのが好ましい。また、RNA-seqの定量値として一般的な、fragments per kilobase of exon per million reads mapped（FPKM）、reads per kilobase of exon per million reads mapped（RPKM）、transcripts per million（TPM）などによって算出される値であってもよい。また、マイクロアレイ法によって得られるシグナル値、及びその補正值であってもよい。また、RT-PCRなどにより特定の標的遺伝子のみ発現レベルの解析を行う場合には、対象遺伝子の発現量をハウスキーピング遺伝子の発現量を基準とする相対的な発現量に変換（相対定量）して解析する方法、又は標的遺伝子の領域を含むプラスミドを用いて絶対的なコピー数を定量（絶対定量）して解析する方法が好ましい。デジタルPCR法によ

て得られるコピー数であってもよい。

ここで、「対照レベル」とは、例えば、健常人における当該標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルが挙げられる。健常人の発現レベルは、健常人集団から測定した当該遺伝子又はその発現産物の発現レベルの統計値（例えば平均値等）であってもよい。標的遺伝子が複数の場合は、各々の遺伝子又はその発現産物について基準発現レベルを求めることが好ましい。

【0050】

また、本発明における乳幼児アトピー性皮膚炎の検出は、本発明の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルの上昇／減少により行うこともできる。この場合は、被験者由来の生体試料における標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルが、各遺伝子又はその発現産物のカットオフ値（参照値）と比較される。カットオフ値は、予め健常者における当該標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを基準データとして取得しておき、それに基づく発現レベルの平均値や標準偏差等の統計的数値に基づき、適宜決定すれば良い。

【0051】

さらに、アトピー性皮膚炎罹患児由来の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルと、健常児由来の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定値を利用して、アトピー性皮膚炎罹患児と健常児とを分ける判別式（予測モデル）を構築し、当該判別式を利用して、乳幼児アトピー性皮膚炎を検出することができる。すなわち、アトピー性皮膚炎罹患児由来の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルと、健常児由来の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定値を教師サンプルとして、アトピー性皮膚炎罹患児と健常児とを分ける判別式（予測モデル）を構築し、当該判別式に基づいてアトピー性皮膚炎罹患児と健常児を判別するカットオフ値（参照値）を求める。なお、判別式の作成においては、主成分分析（PCA）により次元圧縮を行ない、主要成分を説明変数とすることができる。

そして、被験者から採取された生体試料から標的遺伝子又はその発現産物のレベルを同様に測定し、得られた測定値を当該判別式に代入し、当該判別式から得られた結果を参照値と比較することによって、被検者における乳幼児アトピー性皮膚炎の存在又は不存在を評価できる。

【0052】

判別式の構築に用いる変数には説明変数と目的変数がある。説明変数としては、例えば、下記の方法で選択した標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを用いることができる。目的変数としては、例えば、そのサンプルが健常児由来かアトピー性皮膚炎罹患児由来か、を用いることができる。

【0053】

特徴量の選択には、判別する2群間の統計学的に有意な差異、例えば、発現レベルが2群間で有意に変動する遺伝子（発現変動遺伝子）またはその発現産物の発現レベルを用いることができる。また、機械学習に用いるアルゴリズムなどの公知のものを利用して特徴量遺伝子を抽出し、その発現レベルを用いたりすることができる。例えば、下記に示すランダムフォレストにおける変数重要度の高い遺伝子またはその発現産物の発現レベルを用いたり、R言語の“Boruta”パッケージなどを用いて特徴量遺伝子を抽出し、その発現レベルを用いたりすることができる。

【0054】

判別式の構築におけるアルゴリズムは、機械学習に用いるアルゴリズムなどの公知のものを利用することができる。機械学習アルゴリズムの例としては、ランダムフォレスト（Random forest）、線形カーネルのサポートベクターマシン（SVM linear）、rbfカーネルのサポートベクターマシン（SVM rbf）ニューラルネットワーク（Neural network）、一般線形モデル（Generalized linear model）、正則化線形判別分析（Regularized linear discriminant analysis）、正則化ロジスティック回帰（Regularized logistic regression）などが挙げられる。構築した予測モデルに検証用のデータを入力して予測値を算出し、該予測値が実測値と最も

適合するモデル、例えば正解率 (Accuracy) が最も大きいモデルを最適な予測モデルとして選抜することができる。また、予測値と実測値から検出率 (Recall)、精度 (Precision)、及びそれらの調和平均であるF値を計算し、そのF値が最も大きいモデルを最適な予測モデルとして選抜することができる。

【0055】

判別式の構築においてランダムフォレストのアルゴリズムを使用する場合、予測モデルの精度の指標として、未知データに対する推定の誤答率 (OOB error rate) を算出することができる (Breiman L. Machine Learning (2001) 45;5-32)。

【0056】

ランダムフォレストにおいては、ブートストラップ法という手法に従い、全サンプル中から重複を許して、サンプル数の約3分の2のサンプルをランダムに抽出し、決定木と呼ばれる分類器を作成する。この時抽出されなかったサンプルはOut of bag (OOB) と呼ばれ、1本の決定木を用いて、OOBの目的変数の予測を行い、正解ラベルと比較することでその誤答率を算出することができる (決定木におけるOOB error rate)。同様の作業を500回繰り返し行い、500本の決定木におけるOOB error rateの平均値をとった値を、該ランダムフォレストのモデルのOOB error rateとすることができる。

【0057】

なお、ランダムフォレストのモデルを構築する決定木の数 (ntree値) は、デフォルトでは500本であるが、必要に応じて1本から任意の本数に変更することができる。さらに、1つの決定木においてサンプルの判別式の作成に用いる変数の数 (mtry値) は、デフォルトでは説明変数の数の平方根をとった値であるが、必要に応じて1つから全説明変数の数までの値のいずれかに変更することができる。

【0058】

mtry値の決定にはR言語の“caret”パッケージを用いることができる。“caret”パッケージのメソッドにランダムフォレストを指定し、8通りのmtry値を試行し、例えばAccuracyが最大となるmtry値を最適なmtry値として選択することができる。なお、mtry値の試行回数は、必要に応じて任意の試行回数に変更することができる。

【0059】

判別式の構築においてランダムフォレストのアルゴリズムを使用する場合、モデルの構築に用いた説明変数の重要度を数値 (変数重要度) 化することができる。変数重要度の値には、例えば、ジニ係数の減少量 (Mean Decrease Gini) を用いることができる。

【0060】

カットオフ値 (参照値) の決定方法は特に制限されず、公知の手法に従って決定することができる。例えば、判別式を使用して作成されたROC (Receiver Operating Characteristic Curve) 曲線より求めることができる。ROC曲線では、縦軸に陽性患者において陽性の結果がでる確率 (感度) と、横軸に陰性患者において陰性の結果がでる確率 (特異度) を1から減算した値 (偽陽性率) がプロットされる。ROC曲線に示される「真陽性 (感度)」及び「偽陽性 (1 - 特異度)」に関し、「真陽性 (感度)」 - 「偽陽性 (1 - 特異度)」が最大となる値 (Youden index) をカットオフ値 (参照値) とすることができる。

【0061】

既に述べたとおり、IMPDH2、ERI1、FBXW2、STK17B、TAGLN2、AMICA1及びHNRNP A1からなる7種の遺伝子、及び当該7種の遺伝子を含む表3-1~3-3で示される100遺伝子若しくは表4で示される9遺伝子、又は表1-1~1-9で示される371種の遺伝子の特徴量遺伝子として、乳幼児アトピー性皮膚炎の予測が可能な予測モデルを構築することができる。

従って、上記乳幼児アトピー性皮膚炎罹患児群と健常児群とを分ける判別式を作成する

10

20

30

40

50

場合に、標的遺伝子としてIMPDPH2、ERI1、FBXW2、STK17B、TAGLN2、AMICA1及びHNRNPA1からなる7種の遺伝子から選択される1つの遺伝子又は2種以上、好ましくは5種以上、より好ましくは7種全て選択し、その遺伝子又はその発現産物の発現データを用いる。さらに、複数の遺伝子を選択する場合、これら遺伝子の表3-1～3-3における変数重要度のより上位の遺伝子から順に特徴量遺伝子として選択し、判別式を作成するのが好ましい。また、当該7種の遺伝子に、前記表Aで示される441遺伝子、表3-1～3-3で示される100遺伝子、表4で示される9遺伝子、又は表1-1～1-9で示される371遺伝子において、当該7遺伝子以外の遺伝子から選ばれる少なくとも1つ、5以上、10以上、20以上、50以上の遺伝子又はその発現産物の発現データを適宜加えることにより、判別式を作成し、乳幼児アトピー性皮膚炎の検出をすることも可能である。当該7種の遺伝子以外の遺伝子を表3-1～3-3に示される100遺伝子から選択する場合は、変数重要度のより上位の遺伝子から順に、あるいは変数重要度が上位から50位以内、好ましくは30位以内の遺伝子から特徴量遺伝子を選択しても良い。さらに、当該7種の遺伝子以外の遺伝子の特徴量遺伝子として選択する場合には、表1-1～1-9、表3-1～3-3及び表4において＊を付し太字で表示された新規のアトピー性皮膚炎マーカーから特徴量遺伝子を選択するのが好ましい。

また、表1-1～1-9で示される371遺伝子を加える場合には、標的遺伝子としてIMPDPH2、ERI1、FBXW2、STK17B、TAGLN2、AMICA1及びHNRNPA1からなる7種の遺伝子に加えて、371遺伝子中のABHD8、GPT2、PLIN2、FAM100B、YPEL2、MAP1LC3B2、RLF、KIAA0930、UBE2R2、HK2、USF2、PDIA3P、HNRNPUL1、SEC61G、DNAJB11、SDHD、NDUFS7、ECH1、CASS4、IL7R、CLEC4A、AREG、SNRPD1、SLC7A11及びSNX8の25種の遺伝子群より選択される少なくとも1つ、好ましくは表3-1～3-3におけるこれら遺伝子の変数重要度の高いものから少なくとも1つ、5種以上、10種以上、20種以上の遺伝子又はその発現産物の発現データを適宜加えることにより、判別式を作成しても良い。

当該25種の遺伝子は、前述した発現変動解析で抽出された表1-1～1-9に記載の371種の遺伝子群(A)と、ランダムフォレストにより特徴量遺伝子として選択された表3-1～3-3に記載の100種の遺伝子群(B)の共通部分に含まれる遺伝子である。

好ましくは、上記7遺伝子、表1-1～1-9で示される371遺伝子又は318遺伝子(表1-1～1-9において＊を付し太字で表示)、表3-1～3-3で示される100遺伝子又は92遺伝子(表3-1～3-3において＊を付し太字で表示)、又は表4で示される9遺伝子の特徴量遺伝子とする判別式が挙げられる。

より好ましくは、上記7遺伝子、表3-1～3-3で示される100遺伝子又は92遺伝子(表3-1～3-3において＊を付し太字で表示)、又は表4で示される9遺伝子の特徴量遺伝子とする判別式が挙げられる。

【0062】

本発明の乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するための検査用キットは、患者から分離した生体試料における本発明の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを測定するための検査試薬を含有するものである。具体的には、本発明の標的遺伝子又はそれに由来する核酸と特異的に結合(ハイブリダイズ)するオリゴヌクレオチド(例えば、PCR用のプライマー)を含む、核酸増幅、ハイブリダイゼーションのための試薬、或いは、本発明の標的遺伝子の発現産物(タンパク質)を認識する抗体を含む免疫学的測定のための試薬等が挙げられる。当該キットに包含されるオリゴヌクレオチド、抗体等は、上述したとおり公知の方法により得ることができる。

また、当該検査用キットには、上記抗体や核酸の他、標識試薬、緩衝液、発色基質、二次抗体、ブロッキング剤や、試験に必要な器具やポジティブコントロールやネガティブコントロールとして使用するコントロール試薬、生体試料を採取するための用具(例えば、SSLを採取するための脂取りフィルムなど)等を含むことができる。

【0063】

本発明の態様及び好ましい実施態様を以下に示す。

<1>被験者から採取された生体試料について、IMP DH 2、ERI 1、FBXW 2、STK 17B、TAGLN 2、AMICA 1及びHNRNPA 1からなる7種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルを測定する工程を含む、当該被験者における乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法。

<2>IMP DH 2、ERI 1及びFBXW 2からなる3種の遺伝子群より選択される遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定を少なくとも含む、<1>の乳幼児アトピー性皮膚炎の検出方法。

<3>遺伝子又はその発現産物の発現レベルがmRNAの発現量の測定である、<1>又は<2>の方法。

<4>遺伝子又はその発現産物が前記被験者の皮膚表上脂質に含まれるRNAである、<1>～<3>のいずれかの方法。

<5>発現レベルの測定値を前記各遺伝子又はその発現産物の参照値と比較し、乳幼児アトピー性皮膚炎の存在又は不存在を評価する、<1>～<4>のいずれかの方法。

<6>アトピー性皮膚炎罹患児由来の前記遺伝子又はその発現産物の発現レベルと、健常児由来の同遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定値を教師サンプルとして、アトピー性皮膚炎罹患児と健常児を分ける判別式を作成し、被験者から採取された生体試料から得られた同遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定値を当該判別式に代入し、得られた結果を参照値と比較することによって、被験者における乳幼児アトピー性皮膚炎の存在又は不存在を評価する、<1>～<4>のいずれかの方法。

<7>判別式の構築におけるアルゴリズムが、ランダムフォレスト、線形カーネルのサポートベクターマシン、rbfカーネルのサポートベクターマシン、ニューラルネットワーク、一般線形モデル、正則化線形判別分析、又は正則化ロジスティック回帰である<6>の方法。

<8>前記7種の遺伝子群の全ての遺伝子又はその発現産物の発現レベルが測定される、<6>又は<7>の方法。

<9>前記7種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子の他に、後記表3-1～3-3で示される100種、表4で示される9種のうち前記7種の遺伝子を除いた遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルが測定される、<6>～<8>のいずれかの方法。

<10>後記表3-1～3-3で示される100種がランダムフォレストを用いて抽出された特徴量遺伝子である、<9>の方法。

<11>後記表4で示される9種がBoruta法を用いて抽出された特徴量遺伝子である、<9>の方法。

<12>前記7種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子の他に、後記表1-1～1-9で示される371種のうち前記7種に含まれる遺伝子を除いた遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルが測定される、<6>～<8>のいずれかの方法。

<13>前記7種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子の他に、下記の25種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物の発現レベルが測定される、<11>又は<12>の方法、

ABHD 8、GPT 2、PLIN 2、FAM100B、YPEL 2、MAP1LC3B 2、RLF、KIAA0930、UBE2R 2、HK 2、USF 2、PDIA3P、HNRNPUL1、SEC61G、DNAJB11、SDHD、NDUFS7、ECH1、CASS4、IL7R、CLEC4A、AREG、SNRPD1、SLC7A11及びSNX8。

<14>前記遺伝子又はそれに由来する核酸と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、又は前記遺伝子の発現産物を認識する抗体を含有する、<1>～<13>のいずれかの方法に用いられる乳幼児アトピー性皮膚炎を検出するための検査用キット。

10

20

30

40

50

<15>前記B-1～B-2に示される383種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物からなる、乳幼児アトピー性皮膚炎の検出マーカー。

<16>IMP DH2、ERI1、FBXW2、STK17B、TAGLN2、AMICA1及びHNRNPA1からなる7種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物である、<15>の乳幼児アトピー性皮膚炎の検出マーカー。

<17>ABHD8、GPT2、PLIN2、FAM100B、YPEL2、MAP1LC3B2、RLF、KIAA0930、UBE2R2、HK2、USF2、PDIA3P、HNRNPUL1、SEC61G、DNAJB11、SDHD、NDUFS7、ECH1、CASS4、CLEC4A、SNRPD1、SLC7A11及びSNX8からなる23種の遺伝子群より選択される少なくとも1つの遺伝子又はその発現産物である、<15>の乳幼児アトピー性皮膚炎の検出マーカー。

10

【実施例】

【0064】

以下、実施例に基づき本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0065】

実施例1 S S Lから抽出されたRNAにおける乳幼児アトピー性皮膚炎関連の発現変動遺伝子の検出

1) S S L採取

健常皮膚乳幼児(HL)(生後6ヶ月～5歳男女)28名、及びアトピー性皮膚炎乳幼児(AD)(生後6ヶ月～5歳男女)25名を被験者とした。アトピー性皮膚炎の乳幼児は、皮膚科専門医により全顔に皮疹を有し、かつ、重症度が軽度または中等度のアトピー性皮膚炎の診断を受けている。各被験者の全顔(ADは皮疹部を含む)からあぶら取りフィルム(5×8cm、ポリプロピレン製、3M社)を用いて皮脂を回収後、該あぶら取りフィルムをバイアルに移し、RNA抽出に使用するまで-80℃で、約1ヶ月間保存した。

20

【0066】

2) RNA調製及びシーケンシング

上記1)のあぶら取りフィルムを適当な大きさに切断し、QIAzol Lysis Reagent(Qiagen)を用いて、付属のプロトコルに準じてRNAを抽出した。抽出されたRNAを元に、SuperScript VIL0 cDNA Synthesis kit(ライフテクノロジーズジャパン株式会社)を用いて42℃、90分間逆転写を行いcDNAの合成を行った。逆転写反応のプライマーには、キットに付属しているランダムプライマーを使用した。得られたcDNAから、マルチプレックスPCRにより20802遺伝子に由来するDNAを含むライブラリーを調製した。マルチプレックスPCRは、Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit(ライフテクノロジーズジャパン株式会社)を用いて、[99℃、2分→(99℃、15秒→62℃、16分)×20サイクル→4℃、Hold]の条件で行った。得られたPCR産物は、Ampure XP(ベックマン・コールター株式会社)で精製した後に、バッファの再構成、プライマー配列の消化、アダプターライゲーションと精製、増幅を行い、ライブラリーを調製した。調製したライブラリーをIon 540 Chipにローディングし、Ion S5/XLシステム(ライフテクノロジーズジャパン株式会社)を用いてシーケンシングした。

30

40

【0067】

3) データ解析

i) 使用データ

上記2)で測定した被験者由来のRNAの発現量のデータ(リードカウント値)において、DESeq2という手法を用いて補正した。但し、全サンプル被験者の発現量データのうち90%以上のサンプル被験者で欠損値ではない発現量データが得られている3486遺伝子のみ以下の解析に使用した。解析には、DESeq2という手法を用いて補正さ

50

れたカウント値 (Normalized count 値) を用いた。

ii) RNA 発現解析

上記 i) で測定した健常者、及び AD の SSL 由来 RNA 発現量 (Normalized count 値) を基に、健常者と比較して AD において尤度比検定による p 値の補正值 (FDR) が 0.25 未満となる RNA (発現変動遺伝子) を同定した。その結果、310 種の RNA が低下 (DOWN)、61 種の RNA が上昇 (UP) した (表 1-1 ~ 1-9)。

【0068】

【表 1-1】

	Gene symbol	log2(FoldChange)	FDR	Regulation
	DEFB1	-3.00	0.00	DOWN
*	AGR2	-2.86	0.01	DOWN
	GAL	-2.69	0.00	DOWN
	CLU	-2.67	0.00	DOWN
*	SPNS2	-2.66	0.00	DOWN
	HLA-A	-2.63	0.01	DOWN
*	DNASE1L2	-2.47	0.01	DOWN
*	MEST	-2.45	0.01	DOWN
*	HES4	-2.37	0.02	DOWN
*	FAM108C1	-2.35	0.01	DOWN
*	KRT79	-2.34	0.01	DOWN
*	ARL5A	-2.30	0.00	DOWN
*	ALDH3B2	-2.27	0.01	DOWN
*	CALML3	-2.22	0.01	DOWN
*	PLCD3	-2.19	0.01	DOWN
*	OXR1	-2.17	0.01	DOWN
*	ABHD8	-2.16	0.02	DOWN
*	UNC5B	-2.14	0.01	DOWN
*	HSBP1L1	-2.13	0.02	DOWN
*	MARCH3	-2.11	0.01	DOWN
	ASPRV1	-2.11	0.02	DOWN
*	CRAT	-2.11	0.01	DOWN
	DMKN	-2.09	0.03	DOWN
*	PLB1	-2.09	0.03	DOWN
*	CDC34	-2.08	0.00	DOWN
*	FAM84B	-2.06	0.03	DOWN
	CTSA	-2.06	0.00	DOWN
*	TSPAN6	-2.03	0.04	DOWN
*	GPT2	-2.02	0.04	DOWN
*	KRTAP5-5	-2.02	0.06	DOWN
*	SEPT5	-1.99	0.03	DOWN
*	MSMO1	-1.98	0.01	DOWN
*	RRAD	-1.97	0.01	DOWN
*	CHAC1	-1.93	0.02	DOWN
*	SLC40A1	-1.92	0.02	DOWN
*	NIPAL2	-1.90	0.02	DOWN
*	SPTLC3	-1.89	0.08	DOWN
*	EPN3	-1.88	0.03	DOWN
	KLK6	-1.85	0.03	DOWN
*	KLHDC3	-1.85	0.03	DOWN
*	RNF217	-1.76	0.08	DOWN
	CA6	-1.75	0.09	DOWN

【0069】

10

20

30

40

【表 1 - 2】

	Gene symbol	log2(FoldChange)	FDR	Regulation
*	NTAN1	-1.74	0.03	DOWN
*	CDKN2B	-1.73	0.02	DOWN
*	PLIN2	-1.73	0.01	DOWN
*	MARCKS	-1.72	0.01	DOWN
*	RMND5B	-1.72	0.06	DOWN
*	NCCRP1	-1.72	0.02	DOWN
	SLC15A1	-1.72	0.10	DOWN
*	GBA2	-1.71	0.01	DOWN
*	SPAG1	-1.71	0.06	DOWN
	KRT17	-1.71	0.01	DOWN
*	H1FO	-1.71	0.02	DOWN
*	RARG	-1.70	0.07	DOWN
	KLK11	-1.70	0.10	DOWN
*	KRTAP4-9	-1.70	0.15	DOWN
*	SULT2B1	-1.70	0.04	DOWN
*	WIP12	-1.69	0.01	DOWN
*	RUSC2	-1.69	0.08	DOWN
*	SMOX	-1.69	0.07	DOWN
*	GCH1	-1.68	0.10	DOWN
*	MAPK13	-1.67	0.01	DOWN
*	MYZAP	-1.67	0.10	DOWN
*	HS3ST6	-1.66	0.11	DOWN
*	KRTAP12-1	-1.65	0.12	DOWN
	PSORS1C2	-1.65	0.07	DOWN
*	CIDEA	-1.65	0.15	DOWN
*	DSP	-1.65	0.08	DOWN
*	C15orf62	-1.64	0.10	DOWN
*	DHCR24	-1.61	0.07	DOWN
*	KRT34	-1.61	0.25	DOWN
	PCDH1	-1.61	0.10	DOWN
*	ZDHC9	-1.59	0.08	DOWN
*	GNG12	-1.59	0.16	DOWN
*	CTNNBIP1	-1.59	0.02	DOWN
*	FAM193B	-1.58	0.08	DOWN
*	ID1	-1.58	0.07	DOWN
*	KRT86	-1.57	0.18	DOWN
*	KRTAP3-1	-1.57	0.17	DOWN
*	LCE2D	-1.56	0.09	DOWN
*	THRSP	-1.56	0.15	DOWN
*	NR1D1	-1.56	0.09	DOWN
*	IRGQ	-1.55	0.10	DOWN
*	CYB5R1	-1.55	0.04	DOWN

【0 0 7 0】

【表 1 - 3】

	Gene symbol	log2(FoldChange)	FDR	Regulation
*	FAM222B	-1.54	0.07	DOWN
*	DHCR7	-1.53	0.07	DOWN
	CCL3	-1.53	0.10	DOWN
*	FBXO32	-1.52	0.15	DOWN
	CDSN	-1.52	0.10	DOWN
*	CARD18	-1.52	0.15	DOWN
*	MGST1	-1.52	0.15	DOWN
	WASL	-1.51	0.07	DOWN
*	TEX264	-1.51	0.08	DOWN
*	LCE1C	-1.50	0.08	DOWN
	KLK13	-1.50	0.19	DOWN
	INPPL1	-1.50	0.03	DOWN
	SORT1	-1.50	0.03	DOWN
*	STARD5	-1.49	0.10	DOWN
*	TMEM189	-1.49	0.01	DOWN
	A2M	-1.49	0.12	DOWN
*	LY6G6C	-1.47	0.19	DOWN
*	ATP6V1C2	-1.47	0.10	DOWN
*	LYPD5	-1.46	0.15	DOWN
*	BMP2	-1.46	0.15	DOWN
*	HIP1R	-1.45	0.09	DOWN
*	S100A16	-1.45	0.08	DOWN
*	C1orf21	-1.44	0.12	DOWN
*	KLHL21	-1.44	0.10	DOWN
*	GAS7	-1.43	0.01	DOWN
*	LCE1F	-1.43	0.10	DOWN
*	PARD6B	-1.42	0.20	DOWN
*	TM4SF1	-1.42	0.08	DOWN
*	FOXO3	-1.42	0.02	DOWN
*	GDE1	-1.42	0.09	DOWN
*	SH3BP5L	-1.40	0.10	DOWN
*	MAL2	-1.40	0.13	DOWN
*	SLC31A1	-1.40	0.03	DOWN
*	BNIP3	-1.40	0.05	DOWN
*	FAM100B	-1.39	0.01	DOWN
*	PLA2G4E	-1.38	0.15	DOWN
*	SLAMF7	-1.38	0.23	DOWN
	LCN2	-1.38	0.18	DOWN
*	C2orf54	-1.38	0.15	DOWN
*	PIK3AP1	-1.37	0.10	DOWN
*	ATMIN	-1.37	0.07	DOWN
*	KIAA0513	-1.37	0.14	DOWN

【 0 0 7 1 】

【表 1 - 4】

	Gene symbol	log2(FoldChange)	FDR	Regulation
*	GDPD3	-1.36	0.15	DOWN
	FAR2	-1.35	0.09	DOWN
*	KRT80	-1.35	0.13	DOWN
*	EPHX3	-1.35	0.21	DOWN
*	LCE2C	-1.35	0.17	DOWN
*	DNAJB1	-1.34	0.04	DOWN
*	NEDD4L	-1.34	0.20	DOWN
	POR	-1.34	0.06	DOWN
*	IRAK2	-1.33	0.14	DOWN
*	KCTD11	-1.33	0.21	DOWN
*	KRT8	-1.32	0.23	DOWN
*	SMPD3	-1.32	0.16	DOWN
	CD48	-1.32	0.10	DOWN
*	RSC1A1	-1.32	0.10	DOWN
*	PLD3	-1.31	0.08	DOWN
*	HN1L	-1.30	0.10	DOWN
*	PGRMC2	-1.30	0.21	DOWN
*	KDSR	-1.30	0.10	DOWN
*	PPDPF	-1.30	0.01	DOWN
*	LYPLA1	-1.29	0.08	DOWN
*	SDCBP2	-1.29	0.15	DOWN
*	ADIPOR2	-1.29	0.08	DOWN
*	SSFA2	-1.29	0.02	DOWN
	BCL2L1	-1.29	0.01	DOWN
*	YPEL2	-1.28	0.10	DOWN
*	ISG15	-1.28	0.24	DOWN
*	GTPBP2	-1.28	0.07	DOWN
*	DDHD1	-1.27	0.18	DOWN
*	GALNT1	-1.27	0.07	DOWN
*	CRK	-1.26	0.16	DOWN
*	TMEM86A	-1.26	0.21	DOWN
*	HSPA1B	-1.26	0.08	DOWN
*	PTK6	-1.25	0.24	DOWN
*	DUSP16	-1.25	0.03	DOWN
	SLPI	-1.25	0.10	DOWN
*	FCHSD1	-1.24	0.08	DOWN
*	SNX18	-1.24	0.22	DOWN
*	RASA4CP	-1.24	0.18	DOWN
*	CPEB4	-1.23	0.01	DOWN
*	RAB27A	-1.23	0.05	DOWN
*	AKTIP	-1.23	0.16	DOWN
*	RGP1	-1.23	0.15	DOWN

【 0 0 7 2 】

10

20

30

40

【表 1 - 5】

	Gene symbol	log2(FoldChange)	FDR	Regulation
*	MIEN1	-1.23	0.05	DOWN
	SCD	-1.23	0.14	DOWN
*	VKORC1L1	-1.22	0.18	DOWN
*	ABTB2	-1.22	0.10	DOWN
*	AATK	-1.22	0.23	DOWN
*	TUFT1	-1.22	0.24	DOWN
*	MEA1	-1.21	0.10	DOWN
*	HDAC7	-1.21	0.18	DOWN
*	PHLDA2	-1.21	0.03	DOWN
*	MAP1LC3B2	-1.20	0.01	DOWN
*	TMED3	-1.20	0.16	DOWN
	PRR24	-1.19	0.05	DOWN
	SBSN	-1.19	0.21	DOWN
*	HIST1H2BK	-1.19	0.08	DOWN
*	SURF1	-1.19	0.19	DOWN
*	DUSP14	-1.19	0.24	DOWN
*	FAM214A	-1.19	0.09	DOWN
*	FAM102A	-1.17	0.21	DOWN
*	DNAJC5	-1.17	0.07	DOWN
*	TBC1D17	-1.17	0.10	DOWN
*	SH3D21	-1.16	0.17	DOWN
*	MPZL3	-1.16	0.08	DOWN
*	EPB41	-1.16	0.24	DOWN
*	UBAP1	-1.16	0.18	DOWN
*	LRP10	-1.16	0.02	DOWN
*	PAPL	-1.15	0.19	DOWN
*	RALGDS	-1.15	0.15	DOWN
	SHB	-1.15	0.20	DOWN
*	TRIM29	-1.15	0.21	DOWN
	DGAT2	-1.14	0.10	DOWN
*	ADIPOR1	-1.14	0.01	DOWN
*	LCE2A	-1.14	0.23	DOWN
*	BASP1	-1.13	0.09	DOWN
*	RASAL1	-1.12	0.20	DOWN
*	GIPC1	-1.12	0.18	DOWN
*	CLTB	-1.11	0.02	DOWN
*	UBIAD1	-1.11	0.22	DOWN
*	BPGM	-1.11	0.23	DOWN
*	LPCAT1	-1.10	0.24	DOWN
*	RANGAP1	-1.10	0.10	DOWN
*	RLF	-1.09	0.24	DOWN
*	PRSS22	-1.09	0.20	DOWN

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

【表 1 - 6】

	Gene symbol	log2(FoldChange)	FDR	Regulation
*	CTSD	-1.09	0.15	DOWN
*	KIAA0930	-1.09	0.06	DOWN
*	HIST3H2A	-1.09	0.24	DOWN
*	SMS	-1.09	0.23	DOWN
	LGALS3	-1.09	0.01	DOWN
*	TBC1D20	-1.08	0.10	DOWN
*	SERINC2	-1.08	0.15	DOWN
*	KCTD20	-1.07	0.25	DOWN
*	FAM188A	-1.07	0.25	DOWN
*	ASS1	-1.07	0.24	DOWN
*	ZNF664	-1.07	0.08	DOWN
*	UBE2R2	-1.07	0.01	DOWN
*	PPP2CB	-1.07	0.10	DOWN
*	GOLGA4	-1.06	0.10	DOWN
*	ZRANB1	-1.05	0.11	DOWN
	EHF	-1.05	0.24	DOWN
*	TSPAN14	-1.04	0.10	DOWN
*	HK2	-1.04	0.16	DOWN
	KEAP1	-1.04	0.24	DOWN
	ABHD5	-1.04	0.18	DOWN
*	NEU1	-1.03	0.24	DOWN
*	OSBPL2	-1.03	0.10	DOWN
*	RNF103	-1.02	0.07	DOWN
*	FEM1B	-1.02	0.14	DOWN
*	RANBP9	-1.02	0.08	DOWN
*	LOC100093631	-1.02	0.14	DOWN
*	MAP1LC3A	-1.02	0.06	DOWN
*	PRDM1	-1.01	0.05	DOWN
*	SCYL1	-1.01	0.14	DOWN
*	NPC1	-1.01	0.10	DOWN
*	C6orf106	-1.01	0.03	DOWN
*	USP17L5	-1.00	0.22	DOWN
*	BNIP3L	-0.99	0.02	DOWN
*	EAF1	-0.99	0.10	DOWN
*	MIR548I1	-0.99	0.15	DOWN
*	JUP	-0.97	0.18	DOWN
*	PEBP1	-0.97	0.13	DOWN
	HMOX1	-0.96	0.02	DOWN
*	CTSB	-0.96	0.06	DOWN
*	SQSTM1	-0.96	0.08	DOWN
*	VAT1	-0.96	0.13	DOWN
*	CYBASC3	-0.95	0.18	DOWN

【 0 0 7 4 】

10

20

30

40

【表 1 - 7】

	Gene symbol	log2(FoldChange)	FDR	Regulation
*	EIF4EBP2	-0.95	0.05	DOWN
*	ATG2A	-0.94	0.15	DOWN
*	RAD23B	-0.93	0.09	DOWN
*	DSTN	-0.93	0.10	DOWN
*	TPRA1	-0.93	0.15	DOWN
*	BICD2	-0.93	0.16	DOWN
*	RNF11	-0.93	0.09	DOWN
*	ULK1	-0.92	0.18	DOWN
*	SYTL1	-0.91	0.21	DOWN
*	MGLL	-0.91	0.08	DOWN
*	WBP2	-0.90	0.13	DOWN
*	NUDT4	-0.90	0.22	DOWN
*	USF2	-0.89	0.06	DOWN
*	PIM1	-0.88	0.10	DOWN
*	SYPL1	-0.88	0.20	DOWN
*	OTUD5	-0.88	0.14	DOWN
*	IRAK1	-0.87	0.23	DOWN
*	UPK3BL	-0.86	0.18	DOWN
*	PTK2B	-0.84	0.15	DOWN
*	MAPK3	-0.84	0.10	DOWN
*	KRT23	-0.83	0.17	DOWN
*	UBXN6	-0.83	0.19	DOWN
*	ATP6V0C	-0.82	0.07	DOWN
*	ZFAND6	-0.81	0.06	DOWN
*	SLAH2	-0.81	0.18	DOWN
*	NBR1	-0.80	0.15	DOWN
*	ZFAND5	-0.80	0.08	DOWN
*	HSP90AA1	-0.80	0.24	DOWN
*	KIF1C	-0.78	0.25	DOWN
*	CERK	-0.78	0.09	DOWN
*	ATP6V1A	-0.78	0.22	DOWN
*	PQLC1	-0.78	0.13	DOWN
*	CACUL1	-0.77	0.20	DOWN
	PRKCD	-0.76	0.18	DOWN
*	STK10	-0.76	0.18	DOWN
*	IER3	-0.75	0.24	DOWN
	HECA	-0.74	0.18	DOWN
*	DDIT4	-0.74	0.16	DOWN
	TOLLIP	-0.72	0.16	DOWN
*	CHP1	-0.72	0.08	DOWN
*	LAMTOR3	-0.69	0.25	DOWN
	KLF4	-0.68	0.09	DOWN

【 0 0 7 5 】

10

20

30

40

【表 1 - 8】

	Gene symbol	log2(FoldChange)	FDR	Regulation
*	KCNQ1OT1	-0.68	0.18	DOWN
	CAST	-0.68	0.21	DOWN
*	CHMP5	-0.66	0.22	DOWN
*	TNIP1	-0.65	0.18	DOWN
*	SIRPA	-0.65	0.09	DOWN
*	GLRX	-0.61	0.10	DOWN
*	NOTCH2NL	-0.60	0.19	DOWN
*	SLK	-0.59	0.18	DOWN
*	ZFP36L2	-0.59	0.10	DOWN
*	RAB21	-0.58	0.15	DOWN
*	EIF5	-0.57	0.18	DOWN
*	PRELID1	-0.57	0.24	DOWN
*	SQRDL	-0.56	0.19	DOWN
*	SERP1	-0.53	0.24	DOWN
*	RAB7A	-0.44	0.15	DOWN
*	ARF1	-0.37	0.18	DOWN
*	NDUFA1	0.38	0.21	UP
	ENO1	0.45	0.19	UP
*	H2AFY	0.45	0.19	UP
*	GNB2L1	0.50	0.19	UP
*	EIF3K	0.54	0.19	UP
*	DBI	0.58	0.19	UP
*	SH3BGRL3	0.58	0.15	UP
*	PDIA3P	0.60	0.18	UP
*	NDUFB11	0.69	0.23	UP
*	YWHAH	0.69	0.08	UP
	CALR	0.70	0.18	UP
	GSN	0.70	0.08	UP
*	SNORA31	0.71	0.21	UP
*	CST3	0.71	0.21	UP
*	HNRNPUL1	0.71	0.20	UP
*	PDIA6	0.72	0.22	UP
*	ALDH2	0.72	0.22	UP
*	PPIB	0.73	0.07	UP
*	TUBA1B	0.73	0.15	UP
*	SEC61G	0.75	0.19	UP
*	ATP5J2	0.77	0.15	UP
	HLA-DPB1	0.81	0.14	UP
*	RCC2	0.81	0.19	UP
*	AIM1	0.81	0.21	UP
*	DNAJB11	0.83	0.07	UP
	CSF1R	0.83	0.15	UP

【 0 0 7 6 】

10

20

30

40

【表 1 - 9】

	Gene symbol	log2(FoldChange)	FDR	Regulation
*	SYNGR2	0.86	0.23	UP
*	SDHD	0.86	0.09	UP
*	TGFB1	0.89	0.07	UP
*	NDUFS7	0.90	0.21	UP
*	DDOST	0.90	0.15	UP
*	TUBA1A	0.91	0.02	UP
*	ECH1	0.92	0.25	UP
*	IMPDH2	0.94	0.20	UP
*	CASS4	0.95	0.15	UP
	LGALS1	0.95	0.08	UP
	IL7R	0.95	0.18	UP
*	CD52	0.96	0.13	UP
*	HLA-DMA	0.96	0.08	UP
*	CCND2	0.98	0.22	UP
*	S100A4	0.99	0.08	UP
*	ERI1	1.00	0.22	UP
*	FBXW2	1.00	0.23	UP
	PYCARD	1.02	0.13	UP
*	TMX2	1.04	0.20	UP
*	HLA-DOA	1.04	0.24	UP
	MMP12	1.06	0.15	UP
*	CIITA	1.11	0.24	UP
*	ADAM19	1.11	0.18	UP
*	ANPEP	1.11	0.08	UP
*	MAT2A	1.14	0.08	UP
*	CLEC4A	1.17	0.08	UP
	MRC1	1.20	0.14	UP
	AREG	1.21	0.09	UP
*	SNRPD1	1.24	0.14	UP
*	SLC7A11	1.28	0.08	UP
	CLEC10A	1.29	0.15	UP
*	CPVL	1.29	0.10	UP
*	SNX8	1.37	0.09	UP
*	ATP2A2	1.43	0.08	UP
	CCL17	1.59	0.07	UP

【0077】

表 1 - 1 ~ 1 - 9 に示された 371 遺伝子について、公共データベースである STRING を用いて遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析による biological process (BP) の探索を行った。その結果、AD 患者において発現低下した遺伝子群と関連した BP が 144 個得られ、細胞死、角化、免疫応答 (好中球、白血球の脱顆粒)、ミエロイド細胞の活性化や、脂質代謝に関するタームが含まれることが示された (表 2)。また、発現上昇した遺伝子群と関連した BP が 44 個得られ、外因性抗原に対する免疫応答に関するタームなどが含まれた (表 2 - 1 ~ 2 - 4)。一方で、前記表 1 - 1 ~ 1 - 9 に示された 371 遺伝子のうちの 318 遺伝子 (各表において * を付し太字で表示) については、これまでにアトピー性皮膚炎との関連性を示唆する報告がないことから、新規なアトピー性皮膚炎マーカーとなり得ると判断された。

【 0 0 7 8 】

【 表 2 - 1 】

#term ID	term description	FDR	Regulation
GO:0009056	catabolic process	1.75E-07	DOWN
GO:0008219	cell death	2.57E-07	DOWN
GO:0012501	programmed cell death	2.57E-07	DOWN
GO:0044248	cellular catabolic process	3.42E-07	DOWN
GO:0030855	epithelial cell differentiation	3.86E-07	DOWN
GO:0031424	keratinization	9.73E-07	DOWN
GO:0016192	vesicle-mediated transport	1.68E-06	DOWN
GO:1901565	organonitrogen compound catabolic process	1.68E-06	DOWN
GO:0030216	keratinocyte differentiation	1.91E-06	DOWN
GO:0030163	protein catabolic process	2.58E-06	DOWN
GO:1901575	organic substance catabolic process	2.61E-06	DOWN
GO:0009913	epidermal cell differentiation	2.73E-06	DOWN
GO:1901564	organonitrogen compound metabolic process	2.73E-06	DOWN
GO:0006629	lipid metabolic process	6.61E-06	DOWN
GO:0045055	regulated exocytosis	7.10E-06	DOWN
GO:0043588	skin development	1.40E-05	DOWN
GO:0036230	granulocyte activation	4.69E-05	DOWN
GO:0006915	apoptotic process	4.76E-05	DOWN
GO:0043299	leukocyte degranulation	5.04E-05	DOWN
GO:0002275	myeloid cell activation involved in immune response	6.99E-05	DOWN
GO:0002444	myeloid leukocyte mediated immunity	6.99E-05	DOWN
GO:0043312	neutrophil degranulation	6.99E-05	DOWN
GO:0044257	cellular protein catabolic process	7.59E-05	DOWN
GO:0006914	autophagy	8.17E-05	DOWN
GO:0002274	myeloid leukocyte activation	9.35E-05	DOWN
GO:0002252	immune effector process	0.0001	DOWN
GO:0009057	macromolecule catabolic process	0.0001	DOWN
GO:0046903	secretion	0.00014	DOWN
GO:0002443	leukocyte mediated immunity	0.00015	DOWN
GO:0032940	secretion by cell	0.00019	DOWN
GO:0002366	leukocyte activation involved in immune response	0.00027	DOWN
GO:1901701	cellular response to oxygen-containing compound	0.00028	DOWN
GO:0070268	cornification	0.00032	DOWN
GO:0060429	epithelium development	0.00054	DOWN
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	0.00056	DOWN
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	0.00068	DOWN
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	0.00087	DOWN
GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process	0.0012	DOWN
GO:0048731	system development	0.0018	DOWN
GO:0060548	negative regulation of cell death	0.002	DOWN
GO:0043069	negative regulation of programmed cell death	0.0022	DOWN
GO:1903428	positive regulation of reactive oxygen species biosynthetic process	0.0024	DOWN
GO:0009894	regulation of catabolic process	0.0026	DOWN
GO:0046890	regulation of lipid biosynthetic process	0.0026	DOWN
GO:0019216	regulation of lipid metabolic process	0.003	DOWN
GO:0097164	ammonium ion metabolic process	0.0032	DOWN
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	0.0036	DOWN

【 0 0 7 9 】

【表 2 - 2】

#term ID	term description	FDR	Regulation
GO:0010033	response to organic substance	0.0037	DOWN
GO:0043393	regulation of protein binding	0.0037	DOWN
GO:0032502	developmental process	0.0041	DOWN
GO:0031329	regulation of cellular catabolic process	0.0043	DOWN
GO:0007275	multicellular organism development	0.0047	DOWN
GO:0016236	macroautophagy	0.0048	DOWN
GO:0034599	cellular response to oxidative stress	0.0048	DOWN
GO:0051707	response to other organism	0.0048	DOWN
GO:0000422	autophagy of mitochondrion	0.005	DOWN
GO:0010941	regulation of cell death	0.0057	DOWN
GO:0019538	protein metabolic process	0.0058	DOWN
GO:0045321	leukocyte activation	0.0058	DOWN
GO:0009987	cellular process	0.0061	DOWN
GO:0042542	response to hydrogen peroxide	0.0062	DOWN
GO:0097327	response to antineoplastic agent	0.0062	DOWN
GO:2000377	regulation of reactive oxygen species metabolic process	0.0063	DOWN
GO:0044267	cellular protein metabolic process	0.0066	DOWN
GO:0071396	cellular response to lipid	0.0066	DOWN
GO:0002376	immune system process	0.0067	DOWN
GO:0048856	anatomical structure development	0.0067	DOWN
GO:0071345	cellular response to cytokine stimulus	0.0067	DOWN
GO:0006665	sphingolipid metabolic process	0.0068	DOWN
GO:0010821	regulation of mitochondrion organization	0.0087	DOWN
GO:0008152	metabolic process	0.009	DOWN
GO:0051246	regulation of protein metabolic process	0.009	DOWN
GO:2000379	positive regulation of reactive oxygen species metabolic process	0.009	DOWN
GO:0019941	modification-dependent protein catabolic process	0.0097	DOWN
GO:0006810	transport	0.0114	DOWN
GO:0034097	response to cytokine	0.0114	DOWN
GO:0044419	interspecies interaction between organisms	0.0115	DOWN
GO:0009896	positive regulation of catabolic process	0.0117	DOWN
GO:0043067	regulation of programmed cell death	0.0117	DOWN
GO:1901214	regulation of neuron death	0.0117	DOWN
GO:0016241	regulation of macroautophagy	0.0118	DOWN
GO:0090083	regulation of inclusion body assembly	0.0118	DOWN
GO:0009888	tissue development	0.0126	DOWN
GO:0042221	response to chemical	0.0126	DOWN
GO:0006508	proteolysis	0.0153	DOWN
GO:0006979	response to oxidative stress	0.0153	DOWN
GO:0032768	regulation of monooxygenase activity	0.0154	DOWN
GO:0016042	lipid catabolic process	0.0159	DOWN
GO:0030154	cell differentiation	0.0159	DOWN
GO:0033036	macromolecule localization	0.0159	DOWN
GO:0042981	regulation of apoptotic process	0.0159	DOWN
GO:0051234	establishment of localization	0.0159	DOWN
GO:0001775	cell activation	0.0163	DOWN
GO:0071310	cellular response to organic substance	0.0163	DOWN

【 0 0 8 0 】

【表 2 - 3】

#term ID	term description	FDR	Regulation
GO:0006796	phosphate-containing compound metabolic process	0.0164	DOWN
GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	0.0177	DOWN
GO:0018149	peptide cross-linking	0.0177	DOWN
GO:0032870	cellular response to hormone stimulus	0.0177	DOWN
GO:0048513	animal organ development	0.0177	DOWN
GO:0048869	cellular developmental process	0.0177	DOWN
GO:0035690	cellular response to drug	0.0187	DOWN
GO:0008637	apoptotic mitochondrial changes	0.0188	DOWN
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	0.019	DOWN
GO:0006464	cellular protein modification process	0.0191	DOWN
GO:0010917	negative regulation of mitochondrial membrane potential	0.0191	DOWN
GO:0071447	cellular response to hydroperoxide	0.0191	DOWN
GO:0007033	vacuole organization	0.0202	DOWN
GO:0048519	negative regulation of biological process	0.0219	DOWN
GO:0051098	regulation of binding	0.0219	DOWN
GO:0006066	alcohol metabolic process	0.0243	DOWN
GO:0007041	lysosomal transport	0.0243	DOWN
GO:0010243	response to organonitrogen compound	0.0243	DOWN
GO:0010506	regulation of autophagy	0.0243	DOWN
GO:0044403	symbiont process	0.0243	DOWN
GO:0045429	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	0.0243	DOWN
GO:1904407	positive regulation of nitric oxide metabolic process	0.0243	DOWN
GO:0048523	negative regulation of cellular process	0.0248	DOWN
GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	0.0252	DOWN
GO:0071417	cellular response to organonitrogen compound	0.0252	DOWN
GO:0051179	localization	0.0277	DOWN
GO:0050999	regulation of nitric-oxide synthase activity	0.0297	DOWN
GO:0000302	response to reactive oxygen species	0.0311	DOWN
GO:0043433	negative regulation of DNA-binding transcription factor activity	0.0321	DOWN
GO:0009725	response to hormone	0.0333	DOWN
GO:0032268	regulation of cellular protein metabolic process	0.0356	DOWN
GO:1901615	organic hydroxy compound metabolic process	0.0356	DOWN
GO:0031331	positive regulation of cellular catabolic process	0.0375	DOWN
GO:0043523	regulation of neuron apoptotic process	0.0375	DOWN
GO:0097237	cellular response to toxic substance	0.0375	DOWN
GO:0003335	corneocyte development	0.0385	DOWN
GO:0008333	endosome to lysosome transport	0.0385	DOWN
GO:0009636	response to toxic substance	0.0385	DOWN
GO:0034395	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to iron	0.0385	DOWN
GO:0071383	cellular response to steroid hormone stimulus	0.0385	DOWN
GO:0071495	cellular response to endogenous stimulus	0.0385	DOWN
GO:0071985	multivesicular body sorting pathway	0.0385	DOWN
GO:0009617	response to bacterium	0.0395	DOWN
GO:0033993	response to lipid	0.0397	DOWN
GO:0010823	negative regulation of mitochondrion organization	0.0403	DOWN
GO:0070498	interleukin-1-mediated signaling pathway	0.0434	DOWN
GO:0009395	phospholipid catabolic process	0.0456	DOWN
GO:0000045	autophagosome assembly	0.0464	DOWN

【 0 0 8 1】

【表 2 - 4】

#term ID	term description	FDR	Regulation
GO:0051248	negative regulation of protein metabolic process	0.0464	DOWN
GO:0031663	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	0.0499	DOWN
GO:0006955	immune response	0.0045	UP
GO:0001775	cell activation	0.0387	UP
GO:0002376	immune system process	0.0387	UP
GO:0002478	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen	0.0387	UP
GO:0002501	peptide antigen assembly with MHC protein complex	0.0387	UP
GO:0002586	regulation of antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class II	0.0387	UP
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	0.0387	UP
GO:0006119	oxidative phosphorylation	0.0387	UP
GO:0006897	endocytosis	0.0387	UP
GO:0009150	purine ribonucleotide metabolic process	0.0387	UP
GO:0009167	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	0.0387	UP
GO:0009205	purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	0.0387	UP
GO:0009987	cellular process	0.0387	UP
GO:0010033	response to organic substance	0.0387	UP
GO:0010713	negative regulation of collagen metabolic process	0.0387	UP
GO:0016043	cellular component organization	0.0387	UP
GO:0022409	positive regulation of cell-cell adhesion	0.0387	UP
GO:0022900	electron transport chain	0.0387	UP
GO:0030155	regulation of cell adhesion	0.0387	UP
GO:0032981	mitochondrial respiratory chain complex I assembly	0.0387	UP
GO:0034097	response to cytokine	0.0387	UP
GO:0042921	glucocorticoid receptor signaling pathway	0.0387	UP
GO:0045087	innate immune response	0.0387	UP
GO:0045785	positive regulation of cell adhesion	0.0387	UP
GO:0046034	ATP metabolic process	0.0387	UP
GO:0046907	intracellular transport	0.0387	UP
GO:0050863	regulation of T cell activation	0.0387	UP
GO:0051234	establishment of localization	0.0387	UP
GO:0055114	oxidation-reduction process	0.0387	UP
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	0.0387	UP
GO:0071310	cellular response to organic substance	0.0387	UP
GO:0071345	cellular response to cytokine stimulus	0.0387	UP
GO:0071346	cellular response to interferon-gamma	0.0387	UP
GO:0071353	cellular response to interleukin-4	0.0387	UP
GO:0071840	cellular component organization or biogenesis	0.0387	UP
GO:0090197	positive regulation of chemokine secretion	0.0387	UP
GO:0008284	positive regulation of cell population proliferation	0.0403	UP
GO:0045454	cell redox homeostasis	0.0406	UP
GO:0050764	regulation of phagocytosis	0.0416	UP
GO:0006810	transport	0.042	UP
GO:0045321	leukocyte activation	0.042	UP
GO:0016192	vesicle-mediated transport	0.0426	UP
GO:0061024	membrane organization	0.0442	UP
GO:0051641	cellular localization	0.0479	UP

【0082】

実施例 2 ランダムフォレストの変数重要度の高い遺伝子を用いた判別モデルの構築

1) 使用データ

実施例 1 と同様の方法で、被験者からの S S L 由来 R N A の発現量のデータ（リードカウント値）を取得し、サンプル間の総リード数の違いを補正した R P M 値に変換した。ただし、全サンプル中 90% 以上のサンプルで欠損値ではない発現量データが得られている 3486 遺伝子のみ以下の解析に使用した。機械学習モデルの構築には、負の二項分布に従う R P M 値を正規分布に近似するため、整数 1 を加算した底 2 の対数値（ $\text{Log}_2(\text{RPM} + 1)$ 値）を用いた。

10

20

30

40

50

【0083】

2) 特徴量遺伝子の選択

ランダムフォレストのアルゴリズムを用いて特徴量遺伝子の選択を行うために、全サンプル中90%以上のサンプルで欠損値ではない発現量データが得られている3486遺伝子の $\text{Log}_2(\text{RPM}+1)$ 値を説明変数とし、健常者(HL)とADを目的変数として用いた。R言語の“caret”パッケージにおいてランダムフォレストのアルゴリズムをメソッドとして指定し、1回の決定木の構築に用いる変数の数(mtry値)の最適値をチューニングした。チューニングによって決定したmtry値を用いて、ランダムフォレストのアルゴリズムを実行し、ジニ係数に基づく変数重要度の上位100遺伝子を算出した(表3-1~3-3)。これら100遺伝子もしくは、そのうちこれまでにアトピー性皮膚炎との関係が報告されていない92遺伝子(各表において*を付し太字で表示)を特徴量遺伝子として選択した。

10

【0084】

【表 3 - 1】

	Rank	Gene Symbol	Mean Decrease Gini
*	1	AMICA1	2.055595121
*	2	FBXW2	1.353802031
	3	PYCARD	1.033739223
*	4	STK17B	0.978510839
	5	DNAJB11	0.71656419
*	6	ERI1	0.538724844
*	7	ECH1	0.534257071
*	8	MED14	0.482331688
*	9	HYOU1	0.291317096
	10	MAP1LC3B2	0.291025256
	11	IL7R	0.285395284
*	12	CTDSP1	0.25256621
*	13	USP16	0.199302177
*	14	HNRNPA1	0.193749323
	15	CCL17	0.192148161
*	16	UBE2R2	0.18276738
*	17	SDHD	0.182089394
	18	AREG	0.181766398
*	19	TXNDC17	0.180982681
*	20	FBXW4	0.17987884
*	21	FBP1	0.171270238
*	22	FAM100B	0.16614037
*	23	PDIA3P	0.162448803
*	24	ZNF91	0.157466471
*	25	RBM17	0.156733289
*	26	PRPF38B	0.152730954
*	27	ATP5H	0.150590128
*	28	BAX	0.148159853
*	29	ALYREF	0.147856883
*	30	HK2	0.140603185
*	31	PRMT1	0.131508716
*	32	CTSC	0.131417162
*	33	SNRPD1	0.126019405
*	34	TAGLN2	0.124762576
*	35	CYTIP	0.124343512
*	36	CASS4	0.112113307
*	37	SNORA6	0.107783969

10

20

30

40

【 0 0 8 5 】

【表 3 - 2】

	Rank	Gene Symbol	Mean Decrease Gini
*	38	U2AF1	0.10599447
*	39	VPS13C	0.105087046
*	40	SNX8	0.104683402
*	41	NBPF10	0.103533939
*	42	ZNF430	0.102006549
*	43	SPEN	0.099173466
*	44	CIB1	0.098863699
*	45	TMEM33	0.09050211
*	46	NPEPPS	0.089495443
*	47	SEC24D	0.08717598
*	48	SLC7A11	0.085648698
*	49	ARHGDIB	0.083273024
*	50	C10orf128	0.081392728
*	51	HNRNPUL1	0.079931673
*	52	TXN2	0.079583971
	53	CISH	0.079051797
*	54	YWHAG	0.078687752
*	55	GPT2	0.077532431
*	56	KIAA0930	0.075420923
*	57	LAMTOR4	0.074586405
*	58	CRCP	0.073002526
*	59	CLEC4A	0.071813857
*	60	STT3A	0.069062315
*	61	CRISPLD2	0.068308483
*	62	DEFB4B	0.067951618
*	63	CD93	0.06784085
*	64	PLIN3	0.066833805
*	65	USMG5	0.066696653
*	66	LOC285359	0.066466571
*	67	SLC20A1	0.06630307
*	68	MSL1	0.065687379
*	69	SLC11A2	0.065021055
*	70	KHDRBS1	0.064634857
*	71	ABHD8	0.063676494
*	72	CORO1B	0.062873503
*	73	ZFAND2A	0.061802381
	74	DOK2	0.061523251

10

20

30

40

【 0 0 8 6 】

【表 3 - 3】

	Rank	Gene Symbol	Mean Decrease Gini
*	75	PLIN2	0.060826061
*	76	CDC42EP1	0.060499775
*	77	CCM2	0.057445175
*	78	RNF24	0.055689918
*	79	SRPK2	0.054119769
*	80	LST1	0.052995793
*	81	YPEL2	0.052300229
*	82	INF2	0.051988691
*	83	AMD1	0.051853831
	84	ITGAM	0.051474063
*	85	IMPDH2	0.050981003
*	86	CAPG	0.050832747
*	87	VKORC1	0.050813812
*	88	ACSL4	0.050136541
*	89	CDC123	0.04843141
*	90	SCARNA7	0.048153862
*	91	RNASET2	0.047675382
*	92	RLF	0.046521947
*	93	C6orf62	0.046410655
*	94	SLC39A8	0.046281482
*	95	ARHGAP9	0.044962677
*	96	NDUFS7	0.04437666
*	97	SEC61G	0.044157826
	98	SCAP	0.043471551
*	99	TMEM214	0.043214673
*	100	USF2	0.042867138

10

20

30

【0087】

3) モデル構築

上記100遺伝子または92遺伝子の $\log_2(\text{RPM}+1)$ 値を説明変数とし、HLとADを目的変数として用いた。R言語の“caret”パッケージにおいてランダムフォレストのアルゴリズムをメソッドとして指定し、1回の決定木の構築に用いる変数の数(mtry値)の最適値をチューニングした。チューニングによって決定したmtry値を用いて、ランダムフォレストのアルゴリズムを実行し、推定誤答率(OOB error rate)を算出した。その結果、100遺伝子を用いた場合のモデルではOOB error rateが9.43%、92遺伝子を用いた場合のモデルでは13.21%であった。

40

【0088】

実施例3 発現変動遺伝子を用いた判別モデルの構築

1) 使用データ

実施例1と同様の方法で、被験者からのSSL由来RNAの発現量のデータ(リードカウント値)を取得し、サンプル間の総リード数の違いを補正したRPM値に変換した。機械学習モデルの構築には、負の二項分布に従うRPM値を正規分布に近似するため、整数1を加算した底2の対数値($\log_2(\text{RPM}+1)$ 値)を用いた。

【0089】

2) 特徴量遺伝子の選択

50

実施例 2 において健常者 (HL) と比較して AD で有意に発現が変動していた 371 遺伝子 (表 1-1~1-9) もしくは、そのうちこれまでにアトピー性皮膚炎との関係が報告されていない 318 遺伝子 (各表において * を付し太字で表示) を特徴量遺伝子として選択した。

【0090】

3) モデル構築

上記 371 遺伝子または 318 遺伝子の $\log_2 (RPM+1)$ 値を説明変数とし、HL と AD を目的変数として用いた。R 言語の “caret” パッケージにおいてランダムフォレストのアルゴリズムをメソッドとして指定し、1 回の決定木の構築に用いる変数の数 (mtry 値) の最適値をチューニングした。チューニングによって決定した mtry 値を用いて、ランダムフォレストのアルゴリズムを実行し、OOB error rate を算出した。その結果、371 遺伝子を用いた場合のモデルでは OOB error rate が 26.42%、318 遺伝子を用いた場合のモデルでは 30.19% であった。

【0091】

実施例 4 Boruta 法により抽出した特徴量遺伝子を用いた判別モデルの構築

1) 使用データ

実施例 1 と同様の方法で、被験者からの SSL 由来 RNA の発現量のデータ (リードカウント値) を取得し、サンプル間の総リード数の違いを補正した RPM 値に変換した。ただし、全サンプル中 90% 以上のサンプルで欠損値ではない発現量データが得られている 3486 遺伝子のみ以下の解析に使用した。機械学習モデルの構築には、負の二項分布に従う RPM 値を正規分布に近似するため、整数 1 を加算した底 2 の対数値 ($\log_2 (RPM+1)$ 値) を用いた。

【0092】

2) 特徴量遺伝子の選択

全サンプル中 90% 以上のサンプルで欠損値ではない発現量データが得られている 3486 遺伝子の $\log_2 (RPM+1)$ 値を説明変数とし、健常者 (HL) と AD を目的変数として用い、R 言語の “Boruta” パッケージのアルゴリズムを実行した。最大試行回数を 1000 回とし、p 値が 0.01 未満である 9 遺伝子を算出した (表 4)。表 4 に示す 9 遺伝子もしくは、そのうちこれまでにアトピー性皮膚炎との関係が報告されていない 7 遺伝子 (表 4 において * を付し太字で表示) を特徴量遺伝子として選択した。

【0093】

【表 4】

	Gene Symbol
	CCL17
	PYCARD
*	IMPDH2
*	ERI1
*	FBXW2
*	STK17B
*	TAGLN2
*	AMICA1
*	HNRNPA1

【0094】

3) モデル構築

上記 9 遺伝子または 7 遺伝子の $\log_2 (RPM+1)$ 値を説明変数とし、HL と AD を目的変数として用いた。R 言語の “caret” パッケージにおいてランダムフォレストのアルゴリズムをメソッドとして指定し、1 回の決定木の構築に用いる変数の数 (mtry 値) の最適値をチューニングした。チューニングによって決定した mtry 値を用いて、ランダムフォレストのアルゴリズムを実行し、OOB error rate を算出した。その結果、9 遺伝子を用いた場合のモデルでは OOB error rate が 9.43%、7 遺伝子を用いた場合のモデルでは 15.09% であった。

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB10 DA14 FB02 JA06
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR36 QR55
QR72 QR77 QS34 QS36 QX01