(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年11月14日(14.11.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/232368 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/6851 (2018.01) *C12M 1/34* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/017017

(22) 国際出願日： 2024年5月7日(07.05.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-076892 2023年5月8日(08.05.2023) JP

(71) 出願人: 花王株式会社(**KAO CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目１４番１０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 高田 直人(**TAKADA, Naoto**); 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目１４番１０号 花王株式会社内 Tokyo (JP). 桑野 哲矢(**KUWANO, Tetsuya**); 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目１４番１０号 花王株式会社内 Tokyo (JP). 井上 高良(**INOUE, Takayoshi**); 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目１４番１０号 花王株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人アルガ特許事務所(**ARUGA PATENT OFFICE**); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町１丁目３番８号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
一 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** METHOD FOR DETECTING SEVERITY OF ATOPIC DERMATITIS

(54) 発明の名称： アトピー性皮膚炎の重症度の検出方法

(57) **Abstract:** Provided is a method for measuring a gene or an expression product thereof for detecting the severity of atopic dermatitis. In order to detect the severity of atopic dermatitis in a subject, provided is a method for measuring a gene or an expression product thereof in the subject, the method including a step for measuring the expression level of at least one gene or an expression product thereof in a biological sample collected from the subject, wherein the at least one gene is selected from the group consisting of the following 16 genes: C1QB, DIAPH1, LCE1A, CTSV, CTSZ, KRT72, SPINK5, KRT23, KLK5, LCE1B, SPRR1A, PKP1, KRT74, APRT, KRT25 and S100B.

(57) 要約：アトピー性皮膚炎の重症度を検出するための遺伝子又はその発現産物の測定方法を提供する。被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出するために、当該被験者から採取された生体試料について、Ｃ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＣＴＳＺ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３、ＫＬＫ５、ＬＣＥ１Ｂ、ＳＰＲＲ１Ａ、ＰＫＰ１、ＫＲＴ７４、ＡＰＲＴ、ＫＲＴ２５及びＳ１００Ｂからなる１６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遺伝子又はその発現産物の測定方法。

WO 2024/232368 A1

明　細　書

発明の名称 ： アトピー性皮膚炎の重症度の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、アトピー性皮膚炎の重症度マーカーを用いたアトピー性皮膚炎の重症度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。

[0003] アトピー性皮膚炎の発症の有無や重症度は、皮膚の目視観察や皮膚表面の画像解析によりある程度の評価ができる。また、最近では、アトピー性皮膚炎の重症度を客観的に判断することができる方法として、血中のＴＡＲＣ(thymus and activation-regulated chemokine)値やＳＣＣＡ２(Squamous cell carcinoma antigen 2)値を指標とする検査法が用いられている。これらはアトピー性皮膚炎の重症度に依存して血中存在量が増加するため、病勢を鋭敏に反映する指標として用いられ、アトピー性皮膚炎の発症の有無や重症度を評価するだけでなく、患者の教育や治療方針の決定にも用いられる（非特許文献１、２、３参照）。

しかしながら、血中のＴＡＲＣ値やＳＣＣＡ２値を指標とする検査法は採血を必要とするため、侵襲的な方法である。さらに、結果が出るまでに時間を要するなどの課題がある。

[0004] 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１）。さらにＳＳＬからアトピー性皮膚炎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）。

[0005] 〔特許文献１〕国際公開公報第２０１８／００８３１９号

〔特許文献２〕特開２０２０－７４７６９号公報

〔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〕佐伯ら、日本皮膚科学会誌 (2021) 131: 2691-2777.

発明の概要

[0006] 本発明は、以下の１）～２）に係るものである。

１）被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出するために、当該被験者から採取された生体試料について、Ｃ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＣＴＳＺ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３、ＫＬＫ５、ＬＣＥ１Ｂ、ＳＰＲＲ１Ａ、ＰＫＰ１、ＫＲＴ７４、ＡＰＲＴ、ＫＲＴ２５及びＳ１００Ｂからなる１６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遺伝子又はその発現産物の測定方法。

２）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）の方法に用いられるアトピー性皮膚炎の重症度を検出するための検査用キット。

発明の詳細な説明

[0007] 本発明は、アトピー性皮膚炎の重症度を検出するための遺伝子又はその発

現産物の測定方法を提供することに関する。

[0008] 本発明者らは、重症度が異なるアトピー性皮膚炎患者と健常人から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、重症度が異なる患者間及び軽中等症患者と健常人の間で有意に異なり、これを指標としてアトピー性皮膚炎の重症度が検出できることを見出した。

従来、健常人とアトピー性皮膚炎患者の間で発現が変動する遺伝子が存在することは知られているが、その全ての遺伝子が、血中ＴＡＲＣのように健常人に比べて軽中等症患者で、軽中等症患者に比べて重症患者でというように重症度に依存して発現が変動するか否かは知られていない。また、健常人に比べて軽中等症患者又は重症患者で発現が変化している遺伝子であっても、必ずしも軽中等症患者に比べて重症患者で、すなわち重症度に依存して発現が変動するとは限らない。したがって、本発明に係る特定の遺伝子を指標としてアトピー性皮膚炎の異なる重症度を検出できたことは全く意外なことである。

[0009] 本発明によれば、アトピー性皮膚炎の重症度を精度よく客観的に検出することが可能となる。

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 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抗体を産生し易い素因が挙げられる。

[0015] 本発明において、「アトピー性皮膚炎の重症度」とは、アトピー性皮膚炎の進行の程度を意味し、皮疹の状態により、例えば症状なし（健常）、軽微、軽症（軽度）、中等症（中等度）、重症（重度）のように分類される。

皮疹の性状としては、紅斑、浮腫/浸潤/丘疹（充実性、漿液性）、滲出液/痂皮、掻破痕、苔癬化、乾燥、掻痒、痒疹結節、鱗屑（粃糠状、葉状、膜様など）、水疱、膿疱、びらん、潰瘍、などが挙げられ、重症度分類としては、例えば、Eczema Area and Severity Index（「ＥＡＳＩ」＜Exp Dermatol, 2001; 10: 11-18.＞）、Investigator’s Global Assessment（「ＩＧＡ」＜J Am Acad Dermatol, 2016; 74: 288-94.＞）の他、日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎重症度分類検討委員会によるアトピー性皮膚炎重症度分類（日皮会誌＜2001; 111: 2023-2033、日皮会誌, 1998; 108: 1491-1496.＞）、Severity Scoring of Atopic Dermatitis（「ＳＣＯＲＡＤ」＜Dermatology, 1993; 186: 23-31.＞等が知られている。

[0016] 例えば、ＥＡＳＩは、頭頚部、体幹、上肢、下肢を評価部位とし、それぞ

れの評価部位における紅斑、浮腫/浸潤/丘疹、掻破痕、苔癬化の４つの症状別スコアと、評価部位全体に占める上の４つの症状の面積のパーセンテージ（％）に基づいて算出される、０～７２の値である。そのうち、頭頸部ＥＡＳＩは、頭頸部における紅斑、浮腫/浸潤/丘疹、掻破痕、苔癬化の４つの症状別スコアと、頭頸部に占める上の４つの症状の面積のパーセンテージ（％）に基づいて算出された値に０．１を乗じたものであり、０～７．２の値である。頭頸部ＥＡＳＩによる重症度評価は、アトピー性皮膚炎治療薬の投与の目安の一つとしても用いられるものである。

本発明では、アトピー性皮膚炎の重症度として、頭頸部ＥＡＳＩに基づく重症度分類を用いるのが好ましい。

[0017] 本発明のアトピー性皮膚炎の重症度の検出においては、「症状なし」、「軽中等度」及び「重度」の検出ができるが、「症状なし」と「軽中等度」、「軽中等度」と「重度」を区別して検出するのが好ましい。

本発明において、「軽中等度」とは、軽度および中等度の症状（軽中等症）を含むものであり、例えば頭頸部ＥＡＳＩスコアが０より大きく２．４未満であることが該当する。また、「重度」とは、重症を指し、例えば頭頸部ＥＡＳＩスコアが２．４以上７．２以下であることが該当する。また、「症状なし」は、元より健常人であるか、又は寛解若しくはほぼ寛解して症状がなく健常人と同レベルであることを指す。

なお、ＥＡＳＩスコアを用いた「症状なし」、「軽中等度」及び「重度」の評価において、各評価の基準となるスコアの範囲は上の限りでなく、適宜決定することができる。

[0018] 本発明において、アトピー性皮膚炎の重症度の「検出」とは、アトピー性皮膚炎の重症度を明らかにする意味であり、検査、測定、判定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「検出」、「検査」、「測定」、「判定」又は「評価」という用語は、医師によるアトピー性皮膚炎の診断を含むものではない。

[0019] 本発明において測定対象となる遺伝子（以下、「標的遺伝子」とも称す）

は、下記表１に示す１１遺伝子及び表２に示す５遺伝子の計１６遺伝子群より選択される少なくとも１種である。なお表１及び表２に示す遺伝子の名称（Ｇｅｎｅ　Ｓｙｍｂｏｌ）及びＧｅｎｅ　ＩＤは、ＮＣＢＩ（[www.ncbi.nlm.nih.gov/]）に記載のあるＯｆｆｉｃｉａｌ　Ｓｙｍｂｏｌ及びＧｅｎｅ　ＩＤに従う。本発明において、当該標的遺伝子又はその発現産物は、アトピー性皮膚炎の重症度を検出するためのマーカーであると云え、表１に示す遺伝子又はその発現産物をまとめて表１のマーカーともいい、表２に示す遺伝子又はその発現産物をまとめて表２のマーカーともいう。本発明のマーカーは、下記表１又は表２に示す遺伝子であっても、又はその発現産物であっても、それらの組み合わせであってもよい。一実施形態において、本発明のマーカーは、該遺伝子のＤＮＡ、その転写産物であるＲＮＡ等の核酸マーカーである。別の一実施形態において、本発明のマーカーは、該遺伝子の翻訳産物であるタンパク質マーカーである。好ましくは、本発明のマーカーは核酸マーカーであり、より好ましくはＲＮＡマーカーである。

[0020] [表1]

Gene symbol	Gene ID
LCE1A	353131
CTSV	1515
KRT72	140807
SPINK5	11005
KRT23	25984
KLK5	25818
LCE1B	353132
SPRR1A	6698
PKP1	5317
KRT74	121391
KRT25	147183

[0021]

[表2]

Gene symbol	GeneID
C1QB	713
DIAPH1	1729
CTSZ	1522
APRT	353
S100B	6285

[0022] 表１及び表２に示される遺伝子は、それ自体又はそれに由来する発現産物がアトピー性皮膚炎の重症度検出のためのマーカーとして機能する限り、ＮＣＢＩに登録されているヌクレオチド配列からなるものの他、該登録されている配列と実質的に同一の配列からなるものを包含する。ここで、実質的に同一の配列とは、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、当該遺伝子のヌクレオチド配列と９０％以上、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上の同一性がある配列を意味する。

[0023] 後述する実施例に示すように、表１に示される１１種の遺伝子は、その発現レベルがアトピー性皮膚炎の重症度に伴って段階的に低下する、ネガティブマーカーである。具体的には、表１の遺伝子は、健常者と比較して軽中等症患者において発現が低下し、且つ軽中等症患者と比較して重症患者において発現が低下する遺伝子から選択された表皮機能に関連する遺伝子であって、アトピー性皮膚炎の重症度を反映することが既に知られているＴＡＲＣタンパク質をコードする遺伝子であるＣＣＬ１７（Ｇｅｎｅ　ＩＤ：６３６１）よりも重症度判定において判定精度が優れていた遺伝子である。

一方、表２に示される５種の遺伝子は、その発現レベルがアトピー性皮膚炎の重症度に伴って段階的に上昇する、ポジティブマーカーである。具体的には、表２の遺伝子は、健常者と比較して軽中等症患者において発現が上昇し、且つ軽中等症患者と比較して重症患者において発現が上昇する遺伝子から選択された免疫機能に関連する遺伝子であって、アトピー性皮膚炎の重症

度を反映することが既に知られているＴＡＲＣタンパク質をコードする遺伝子であるＣＣＬ１７よりも重症度判定において判定精度が優れていた遺伝子である。

よって、斯かる表１及び表２のマーカーによれば、健常と軽中等度アトピー性皮膚炎の判別、及び軽中等度アトピー性皮膚炎と重度アトピー性皮膚炎の判別が可能である。

なお、前者のネガティブマーカーと、後者のポジティブマーカーのいずれか一方を使用してもよく、又は両方を組み合わせて使用してもよい。

[0024] 本発明の被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出するための、当該被験者における遺伝子又はその発現産物の測定方法は、被験者から採取された生体試料について、上記の標的遺伝子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。

[0025] 本発明の被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出するための当該被験者は、その性別、年齢及び人種等は特に限定されず、乳児から老人までを含み得る。好ましくは、該被験者は、アトピー性皮膚炎の重症度の検出を必要とするか又は希望するヒトである。例えば、該被験者は、アトピー性皮膚炎を発症しているヒト、アトピー性皮膚炎の発症が疑われるヒト又は遺伝的にアトピー性皮膚炎の素因を有するヒトである。

[0026] 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重症度に応じて本発明の標的遺伝子が発現変化する細胞、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、角層、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。

[0027] 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１参照）。また本発明において、「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。

[0028] 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。また、ＳＳＬが採取される皮膚の部位は、アトピー性皮膚炎が発症している皮疹部であっても、発症していない無疹部であってもいずれでもよいが、好ましくは、皮疹部又は皮疹部近傍の無疹部が好ましい。ここで皮疹部近傍とは、皮疹部に隣接する１０ｃｍ以内の範囲を指す。

[0029] 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℃±２０℃～－８０℃±２０℃、より好ましくは－２０℃±１０℃～－８

０℃±１０℃、さらに好ましくは－２０℃±２０℃～－４０℃±２０℃、さらに好ましくは－２０℃±１０℃～－４０℃±１０℃、さらに好ましくは－２０℃±１０℃、さらに好ましくは－２０℃±５℃である。該ＲＮＡ含有ＳＳＬの該低温条件での保存の期間は、特に限定されないが、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。

[0030] 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、及び上記いずれかの複合体が挙げられる。また、発現レベルとは、当該遺伝子又は発現産物の発現量や活性を包括的に意味する。

[0031] 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。

[0032] 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。

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。

[0033] 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、ＳｍａｒｔＡｍｐ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、ドットブロットハイブリダイゼーション、スロットブロットハイブリダイゼーション、ノーザンブ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。

[0034] 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℃±１℃、より好ましくは６２℃±０．５℃、さらに好ましくは６２℃±０．２５℃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９５～９９℃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。

[0035] 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。

[0036] 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）ＶＩＬＯ 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×ＶＩＬＯ 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×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。

[0037] 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。

[0038] 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対のプライマー（上記ｃＤＮＡ（－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。

[0039] 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, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)等に記載されている。

[0040] 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。

[0041] 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、ハ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。

[0042] 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、本発明の発現産物を特異的に認識する抗体、具体的には発現産物であるタンパク質を他のタンパク質から識別することが可能な構造的特徴部位（エピトープ）を認識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ポリペプチド又は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髄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)）。

[0043] 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アトピー性皮膚炎の重症度が検出される。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ってもよい。

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（Love MI et al. Genome Biol. 2014）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、及びその補正値であってもよい。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法によって得られ

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、軽中等症患者の検出の際は健常人における、重症患者の検出の際は軽中等症患者における、当該標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルが挙げられる。健常人、軽中等症患者及び重症患者の発現レベルは、健常人、軽中等症患者、重症患者の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対照レベルを求めることが好ましい。

[0044] また、本発明におけるアトピー性皮膚炎の重症度の検出は、本発明の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを、各遺伝子又はその発現産物のカットオフ値（参照値）と比較することにより行うこともできる。カットオフ値は、予め健常者、軽症患者、中等症患者及び重症患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。

[0045] 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、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（感度又は真陽性率）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「真陽性率（感度）」及び「偽陽性率（１－特異度）」に関し、「真陽性率（感度）」－「偽陽性率（１－特異度）」が最大となる点（Ｙｏｕｄｅｎ　ｉｎｄｅｘ）における閾値をカットオフ値（参照値）とすることができる。

[0046] 例えば、表１で示される遺伝子について、重症度が異なる２群を判別するためのカットオフ値（参照値）をあらかじめ定めておき、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）以上であればより重症度が低い群、発現レベルが参照値以下であればより重症度が高い群であるなどと判別される。

[0047] また、例えば、表２で示される遺伝子について、重症度が異なる２群を判別するためのカットオフ値（参照値）をあらかじめ定めておき、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）以下であればより重症度が低い群、発現レベルが参照値以上であればより重症度が高い群であるなどと判別される。

[0048] 後述する表３に示すとおり、本発明の１６種の標的遺伝子を用いた、健常と軽中等度アトピー性皮膚炎の２群、軽中等度アトピー性皮膚炎と重度アトピー性皮膚炎の２群の判別において、それぞれの２群の判別のためのＲＯＣ曲線の曲線下面積（ＡＵＣ１及びＡＵＣ２）の平均値（ＡＵＣ３）は、何れも、重症度マーカーとして公知のＴＡＲＣタンパク質をコードするＣＣＬ１７遺伝子を用いた場合のＡＵＣ３よりも高く、その判別精度は高い。

カットオフ値（参照値）は前述のとおり、当該ＲＯＣ曲線に示される「真陽性率（感度）」及び「偽陽性率（１－特異度）」に関し、「真陽性率（感度）」－「偽陽性率（１－特異度）」が最大となる点（Ｙｏｕｄｅｎ　ｉｎｄｅｘ）における閾値を以て決定することができる。１６遺伝子を用いて、健常と軽中等度アトピー性皮膚炎の２群、軽中等度アトピー性皮膚炎と重度アトピー性皮膚炎の２群の判別する場合の各参照値の一例を表３に示すが、この限りではなく適宜決定することができる。

[0049] また、別の一実施形態においては、被験者における標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを測定し、測定した当該発現レベルを、予め設定した基準値と比較することによって、該被験者のアトピー性皮膚炎の重症度を検出することができる。

該基準値は、アトピー性皮膚炎の重症度（アトピー性皮膚炎の重症度に係るスコア値に基づいて分類されたアトピー性皮膚炎の重症度レベル又はアト

ピー性皮膚炎の重症度に係るスコア値）と標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルの関係に基づき、予め決定することができる。例えば、ある集団を、アトピー性皮膚炎の重症度に基づいて異なる重症度の複数の群に分け、それぞれの群における標的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）を参考に、それぞれの群への属否を判別する基準値を決定することができる。標的遺伝子又はその発現産物として複数種のマーカーを用いる場合は、各々のマーカーについて基準値を求めることが好ましい。該集団としては、アトピー性皮膚炎を有する患者群でも、健常者とアトピー性皮膚炎を有する患者群を合わせた群でも、特定の重症度のアトピー性皮膚炎を有する患者群でもいずれでも良い。また、検出の対象となる被験者に応じて、年代ごと、世代ごと、男女ごとあるいは人種ごとに集団を作成してもよい。

基準値の算出に用いられる群の例としては、軽症患者群（軽症群）、中等症患者群（中等症群）、軽症及び中等症患者群（軽中等症群）、重症患者群（重症群）などが挙げられる。対照としての健常群（アトピー性皮膚炎の症状を有さない群）を含めてもよい。

[0050] 該ネガティブマーカーを用いる場合、その発現レベルが低いほど、被験者のアトピー性皮膚炎の重症度は高いと検出される。一方、該ポジティブマーカーを用いる場合、その発現レベルが高いほど、被験者のアトピー性皮膚炎の重症度は高いと検出される。

[0051] 基準値の設定、及び該基準値に基づく重症度の分類の具体的手法は、当業者の技術常識に従って適宜実施することができる。

[0052] さらに別の一実施形態においては、被験者における標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを異なる時期に測定し、測定した標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを比較することで、該被験者のアトピー性皮膚炎の重症度の変化（例えば増悪又は軽快）を検出することができる。

[0053] ネガティブマーカーを用いる場合、その発現レベルの経時的増加は、被験者のアトピー性皮膚炎の重症度の低下を表し、一方、発現レベルの経時的低下は、被験者のアトピー性皮膚炎の重症度の上昇を表す。一例においては、

過去の測定での同じ被験者における標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを基準値とする。被験者から測定したネガティブマーカーの発現レベルが基準値よりも高い場合、該被験者のアトピー性皮膚炎の重症度は低下したと検出され、一方、被験者から測定したネガティブマーカーの発現レベルが基準値よりも低い場合、該被験者のアトピー性皮膚炎の重症度は上昇したと検出される。必要に応じて、該過去の測定の際に従来の手法で該被験者のアトピー性皮膚炎の重症度判定を行ってもよい。その場合、被験者から測定したネガティブマーカーの発現レベルが基準値よりも高い又は低いとき、該被験者のアトピー性皮膚炎の重症度は該過去の測定でのアトピー性皮膚炎の重症度より低い又は高いと検出され得る。

[0054] ポジティブマーカーを用いる場合、その発現レベルの経時的増加は、被験者のアトピー性皮膚炎の重症度の上昇を表し、一方、発現レベルの経時的低下は、被験者のアトピー性皮膚炎の重症度の低下を表す。一例においては、過去の測定での同じ被験者における標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを基準値とする。被験者から測定したポジティブマーカーの発現レベルが基準値よりも高い場合、該被験者のアトピー性皮膚炎の重症度は上昇したと検出され、一方、被験者から測定したポジティブマーカーの発現レベルが基準値よりも低い場合、該被験者のアトピー性皮膚炎の重症度は低下したと検出される。必要に応じて、該過去の測定の際に従来の手法で該被験者のアトピー性皮膚炎の重症度判定を行ってもよい。その場合、被験者から測定したポジティブマーカーの発現レベルが基準値よりも高い又は低いとき、該被験者のアトピー性皮膚炎の重症度は該過去の測定でのアトピー性皮膚炎の重症度より高い又は低いと検出され得る。

[0055] 本発明の方法の一実施形態においては、被験者由来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、基準値に対して好ましくは９１％以下、より好ましくは８３％以下、さらに好ましくは７７％以下であれば、該標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルは基準値より低いと判断され得、本発明の標的遺伝子又はその発現産物発現レベルが、基準値に対して好ましくは

１１０％以上、より好ましくは１２０％以上、さらに好ましくは１３０％以上であれば、該標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルは基準値より高いと判断され得る。あるいは、被験者由来の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルと基準値との差異は、例えば両者が統計学的に有意に異なるか否かによって判断することができる。標的遺伝子又はその発現産物として複数のマーカーを用いる場合には、個々の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを基準値と比較し、一定割合、例えば５０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは１００％の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルが基準値と異なるか否かを調べることで、アトピー性皮膚炎の重症度を検出することができる。

[0056] また、別の一実施形態においては、被験者における標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを測定し、該発現レベルをアトピー性皮膚炎の重症度を検出する判別式（予測モデル）に代入し、被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出することができる。

具体的には、重症度が異なるアトピー性皮膚炎患者（例えば、軽症患者、軽中等症患者、中等症患者、重症患者）由来の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベル及び健常人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、教師サンプルの各人から取得した少なくとも１つ以上の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを説明変数とし、各人のアトピー性皮膚炎の重症度（例えば、軽度、軽中等度、中等度、重度）又は症状なし（健常）を目的変数とする機械学習により、判別式を構築することができる。そして、被験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測定し、該発現レベルを当該判別式に代入することで、被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出することができる。

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。

[0057] 判別式の構築におけるアルゴリズムとしては、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（Ｎｅｒｕｒａｌ　ｎｅｔ）、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。

[0058] 本発明のアトピー性皮膚炎の重症度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を採取するためのあぶら取りフィルムなど）等を含むことができる。

[0059] 上述した実施形態に関し、本発明においてはさらに以下の態様が開示される。

＜１＞被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出するために、当該被験者から採取された生体試料について、Ｃ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＣＴＳＺ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３、ＫＬＫ５、ＬＣＥ１Ｂ、ＳＰＲＲ１Ａ、ＰＫＰ１、ＫＲＴ７４、ＡＰＲＴ、ＫＲＴ２５及びＳ１００Ｂからなる１６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遺伝子又はその発現産物の測定方法。

＜２＞被験者から採取された生体試料について、Ｃ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＣＴＳＺ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３、ＫＬＫ５、ＬＣＥ１Ｂ、ＳＰＲＲ１Ａ、ＰＫＰ１、ＫＲＴ７４、ＡＰＲＴ、ＫＲＴ２５及びＳ１００Ｂからなる１６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アトピー性皮膚炎の重症度の検出方法。

＜３＞前記遺伝子がＣ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＣＴＳＺ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３及びＫＬＫ５からなる９種の遺伝子群より選択される少なくとも１つの遺伝子、好ましくはＣ１ＱＢである、＜１＞又は＜２＞に記載の方法。

＜４＞前記遺伝子がＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３、ＫＬＫ５、ＬＣＥ１Ｂ、ＳＰＲＲ１Ａ、ＰＫＰ１、ＫＲＴ７４及びＫＲＴ２５からなる１１種の遺伝子群、好ましくはＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３及びＫＬＫ５からなる６種の遺伝子群より選択される少なくとも１つの遺伝子であり、該遺伝子又はその発現産物の発現レベルが低いほど、前記被験者のアトピー性皮膚炎の重症度が高いと検出する、＜１＞又は＜２＞の方法。

＜５＞重症度が異なる２群を判別するための参照値をあらかじめ定めておき、アトピー性皮膚炎患者の遺伝子又はその発現産物の発現レベルが該参照

値以上であればより重症度が低い群、該参照値以下であれば重症度が高い群であると判別する、＜４＞の方法。

＜６＞前記遺伝子がＣ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＣＴＳＺ、ＡＰＲＴ及びＳ１００Ｂからなる５種の遺伝子群、好ましくはＣ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１及びＣＴＳＺからなる３種の遺伝子群より選択される少なくとも１つの遺伝子であり、該遺伝子又はその発現産物の発現レベルが高いほど、前記被験者のアトピー性皮膚炎の重症度が高いと検出する、＜１＞又は＜２＞の方法。

＜７＞重症度が異なる２群を判別するための参照値をあらかじめ定めておき、アトピー性皮膚炎患者の遺伝子又はその発現産物の発現レベルが該参照値以下であればより重症度が低い群、該参照値以上であれば重症度が高い群であると判別する、＜６＞の方法。

＜８＞重症度が症状なし（健常）、軽中等度及び重度から選ばれる１以上である、＜１＞～＜７＞のいずれかの方法。

＜９＞重症度が異なる２群が、健常と軽中等度アトピー性皮膚炎の２群、又は軽中等度アトピー性皮膚炎と重度アトピー性皮膚炎の２群である、＜５＞又は＜７＞の方法。

＜１０＞重症度が異なるアトピー性皮膚炎患者由来の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベル及び健常人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構築した判別式に、被験者における標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定値を代入し、被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出する、＜１＞又は＜２＞の方法。

＜１１＞重症度が、軽度、軽中等度、中等度及び重度から選ばれる１以上である、＜１０＞の方法。

＜１２＞判別式が、教師サンプルの各人から取得した少なくとも１つ以上の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルを説明変数とし、各人のアトピー性皮膚炎の重症度及び症状なし（健常）を目的変数とする機械学習により構築される、＜１０＞又は＜１１＞の方法。

＜１３＞機械学習に用いるアルゴリズムが、ランダムフォレスト（Ｒａｎ

ｄｏｍ　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（Ｎｅｒｕｒａｌ　ｎｅｔ）、一般線形モデル（Ｇｅｎｅｒａｌｉｚｅｄ　ｌｉｎｅａｒ　ｍｏｄｅｌ）、正則化線形判別分析（Ｒｅｇｕｌａｒｉｚｅｄ　ｌｉｎｅａｒ　ｄｉｓｃｒｉｍｉｎａｎｔ　ａｎａｌｙｓｉｓ）及び正則化ロジスティック回帰（Ｒｅｇｕｌａｒｉｚｅｄ　ｌｏｇｉｓｔｉｃ　ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎ）から選ばれる、＜１２＞の方法。

＜１４＞前記遺伝子又はその発現産物の発現レベルがｍＲＮＡの発現量である、＜１＞～＜１３＞のいずれかの方法。

＜１５＞前記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＞～＜１４＞のいずれかの方法。

＜１６＞重症度が、頭頚部ＥＡＳＩに基づく重症度分類である、＜１＞～＜１５＞のいずれかの方法。

＜１７＞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＞～＜１６＞のいずれかの方法に用いられるアトピー性皮膚炎の重症度を検出するための検査用キット。

＜１８＞被験者から採取された生体試料に由来する、Ｃ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＣＴＳＺ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３、ＫＬＫ５、ＬＣＥ１Ｂ、ＳＰＲＲ１Ａ、ＰＫＰ１、ＫＲＴ７４、ＡＰＲＴ、ＫＲＴ２５及びＳ１００Ｂからなる１６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、アトピー性皮膚炎の重症度マーカーとしての使用。

＜１９＞前記遺伝子又はその発現産物が、Ｃ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＣＴＳＺ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３又はＫＬＫ５からなる９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、好ましくはＣ１ＱＢ又はその発現産物である、＜１８＞の

使用。

＜２０＞前記遺伝子又はその発現産物が、前記被験者から採取された皮膚表上脂質に由来するｍＲＮＡである、＜１８＞又は＜１９＞の使用。

＜２１＞重症度が、頭頚部ＥＡＳＩに基づく重症度である、＜１８＞～＜２０＞のいずれかの使用。

実施例

[0060] 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。

実施例１　ＳＳＬから抽出されたＲＮＡを用いたアトピー性皮膚炎の重症度の検出

１）軽中等度アトピー性皮膚炎患者の診断およびＳＳＬ採取

健常者（２５～５７歳、男性）１４名、及びアトピー性皮膚を有する成人（ＡＤ）（２３～５６歳、男性）２９名を被験者とした。当該アトピー性皮膚炎患者は、皮膚科専門医により重症度が軽度及び中等度のアトピー性皮膚炎の診断を受けている。診断には頭頚部ＥＡＳＩスコア（Hanifin et al. Exp dermatol.10, 2001）を用い、当該患者の頭頚部ＥＡＳＩスコアは０．１～１．８（平均値０．５０）の値を示した。各被験者の全顔からあぶら取りフィルム（ポリプロピレン製、５．０ｃｍ×８．０ｃｍ、３M社）１枚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。

[0061] ２）重度アトピー性皮膚炎患者の診断およびＳＳＬ採取

健常者（２４～５９歳、男性）３０名、及びアトピー性皮膚を有する成人（ＡＤ）（２１～５９歳、男性）３０名を被験者とした。当該アトピー性皮膚炎患者は、皮膚科専門医により重症度が重度のアトピー性皮膚炎の診断を受けている。診断には頭頚部ＥＡＳＩスコア（Hanifin et al. Exp dermatol.10, 2001）を用い、当該患者の頭頚部ＥＡＳＩスコアは２．４～６．６（平均値３．０）の値を示した。各被験者の全顔からあぶら取りフィルム（ポリプロピレン製、５．０ｃｍ×８．０ｃｍ、３M社）１枚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。

[0062] ３）ＲＮＡ調製及びシーケンシング

上記１）及び２）で皮脂を回収した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を水層に移行させた。該水層から、ＲＮＡ抽出用スピンカラムを用いた市販のＲＮＡ抽出キットを用いて、付属のプロトコルに従いＲＮＡを抽出した。抽出されたＲＮＡを、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＶＩＬＯ 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分間逆転写し、ｃＤＮＡを合成した。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、バッファーの再構成、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、及び増幅を行い、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。シーケンシングで得られた各リード配列をヒトゲノムのリファレンス配列であるｈｇ１９ ＡｍｐｌｉＳｅｑ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅ ＥＲＣＣ ｖ１を用いて遺伝子マッピングすることで各リード配列の由来する遺伝子を決定した。

[0063] ４）データ解析：頭頚部ＥＡＳＩスコアによる重症度に伴って発現変動する遺伝子

ｉ）使用データ

上記３）で測定した合計４４名の健常者、２９名の軽中等度ＡＤ患者及び３０名の重度ＡＤ患者のＳＳＬ由来ＲＮＡの発現量のデータ（リードカウント値）について、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７１７７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れたカウント値（Ｎｏｒｍａｌｉｚｅｄ　ｃｏｕｎｔ値）を用いた。

[0064] ｉｉ）ＲＮＡ発現解析１

上記ｉ）で測定した健常者、及び軽中等度ＡＤのＳＳＬ由来ＲＮＡ発現量（Ｎｏｒｍａｌｉｚｅｄ　ｃｏｕｎｔ値）を基に、健常者と比較して軽中等度ＡＤにおいて尤度比検定によるｐ値の補正値（ＦＤＲ）が０．１未満となるＲＮＡ（発現変動遺伝子）を同定した。その結果、１４２４種のＲＮＡが軽中等度ＡＤにおいて低下（ＤＯＷＮ）、１９６６種のＲＮＡが軽中等度ＡＤにおいて上昇（ＵＰ）した。

[0065] ｉｉｉ）ＲＮＡ発現解析２

上記ｉ）で測定した軽中等度ＡＤ及び重度ＡＤのＳＳＬ由来ＲＮＡ発現量（Ｎｏｒｍａｌｉｚｅｄ　ｃｏｕｎｔ値）を基に、軽中等度ＡＤと比較して重度ＡＤにおいて尤度比検定によるｐ値の補正値（ＦＤＲ）が０．１未満となるＲＮＡ（発現変動遺伝子）を同定した。その結果、１４３６種のＲＮＡが重度ＡＤにおいて低下（ＤＯＷＮ）、１４１７種のＲＮＡが重度ＡＤにおいて上昇（ＵＰ）した。

[0066] ｉｖ）重症度に伴って段階的に発現が低下する遺伝子の抽出

上記ｉｉ）で同定した健常者と比較して軽中等度ＡＤにおいて発現が低下した１４２４遺伝子、及びｉｉｉ）で同定した軽中等度ＡＤと比較して重度ＡＤにおいて発現が低下した１４３６遺伝子のいずれにも該当する遺伝子を抽出したところ、７４種の遺伝子が該当した。該７４種の遺伝子は、ＡＤの重症度に伴って段階的に発現が低下する可能性のある遺伝子、即ちその発現

量の高低によってアトピー性皮膚炎の重症度を検出し得る遺伝子である。これら遺伝子のうち、関連するＲｅａｃｔｏｍｅ　Ｐａｔｈｗａｙ やＧＯタームを構成する遺伝子の他、当業者が知り得る文献で報告のある遺伝子などの情報を基に、表皮の機能に関連する遺伝子として１３種の遺伝子を抽出した。そしてこれら１３種の遺伝子を候補として、次の５）における評価でより判別精度の高い遺伝子を選抜した。

[0067] ｖ）重症度に伴って段階的に発現が上昇する遺伝子の抽出

上記ｉｉ）で同定した健常者と比較して軽中等度ＡＤにおいて発現が上昇した１９６６遺伝子、及びｉｉｉ）で同定した軽中等度ＡＤと比較して重度ＡＤにおいて発現が上昇した１４１７遺伝子のいずれにも該当する遺伝子を抽出したところ、３４種の遺伝子が該当した。該３４種の遺伝子は、ＡＤの重症度に伴って段階的に発現が上昇する可能性のある遺伝子、即ちその発現量の高低によってアトピー性皮膚炎の重症度を検出し得る遺伝子である。これら遺伝子のうち、関連するＲｅａｃｔｏｍｅ　Ｐａｔｈｗａｙ やＧＯタームを構成する遺伝子の他、当業者が知り得る文献で報告のある遺伝子などの情報を基に、免疫の機能に関連する遺伝子として９種の遺伝子を抽出した。それらの中にはＡＤの重症度を反映することが既に知られているＴＡＲＣタンパク質をコードする遺伝子であるＣＣＬ１７が含まれていた。そしてこれら９種の遺伝子を候補として、次の５）における評価でより判別精度の高い遺伝子を選抜した。

[0068] ５）より精度の高い重症度判別マーカーの選抜

ｉ）健常と軽中等度ＡＤの判別

上記４）のｉｖ）及びｖ）で抽出した合計２２種の遺伝子について、ＲＯＣ曲線を用いて、健常と軽中等度ＡＤを判別する精度の評価を行った。ＲＯＣ曲線は、ある連続値の大小を指標として、あるサンプルが陰性であるか陽性であるかを判別する際に、陰性群と陽性群において、縦軸に陽性群において陽性の結果がでる確率（感度又は真陽性率）と、横軸に陰性群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曲線の曲線下面積（ＡＵＣ）が大きいほど、２群の判別精度は高いと判断される。上記ｉｖ）の１３遺伝子が健常と軽中等度ＡＤを判別する精度の評価においては、軽中等症ＡＤを陰性群、健常を陽性群とした。上記ｖ）の９遺伝子が健常と軽中等症ＡＤを判別する精度の評価においては、健常を陰性群、軽中等症ＡＤを陽性群とした。そして２２種の各遺伝子の、Ｙｏｕｄｅｎ　ｉｎｄｅｘにおける正答率（正答率１）、その時のＡＵＣの値（ＡＵＣ１）及びカットオフ値（参照値１）を求めた。

[0069] ｉｉ）軽中等度ＡＤと重度ＡＤの判別

上記４）のｉｖ）及びｖ）で抽出した２２種の遺伝子について、ＲＯＣ曲線を用いて、軽中等度ＡＤと重度ＡＤを判別する精度の評価を行った。上記ｉｖ）の１３遺伝子が軽中等度ＡＤと重度ＡＤを判別する精度の評価においては、重度ＡＤを陰性群、軽中等度ＡＤを陽性群とした。上記ｖ）の９遺伝子が軽中等度ＡＤと重度ＡＤを判別する精度の評価においては、軽中等度ＡＤを陰性群、重度ＡＤを陽性群とした。そして２２種の各遺伝子の、Ｙｏｕｄｅｎ　ｉｎｄｅｘにおける正答率（正答率２）、その時のＡＵＣの値（ＡＵＣ２）及びカットオフ値（参照値２）を求めた。

[0070] ｉｉｉ）健常、軽中等度ＡＤ及び重度ＡＤの判別に適する、より精度の高い遺伝子の選抜

上記４）で抽出した計２２種類の遺伝子のうち、いずれの遺伝子が健常と軽中等度ＡＤの判別及び軽中等度ＡＤと重度ＡＤの判別のいずれをも精度よく行えるかどうかを、ＡＵＣ１とＡＵＣ２の平均値（ＡＵＣ３）を算出し、これを指標として評価した（表３）。そして、ＡＤの重症度を反映することが既に知られているＴＡＲＣタンパク質をコードする遺伝子であるＣＣＬ１７のＡＵＣ３＝０．６９３を比較対象とし、これに比べＡＵＣ３がより大きい遺伝子を抽出した。その結果、上記４）のｉｖ）で抽出した１３種の遺伝子からは、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３、ＫＬＫ５、ＬＣＥ１Ｂ、ＳＰＲＲ１Ａ、ＰＫＰ１、ＫＲＴ７４及びＫＲＴ２５の１１遺伝子が抽出された。また上記４）のｖ）で抽出した９種の遺伝

子からは、ＣＩＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＣＴＳＺ、ＡＰＲＴ及びＳ１００Ｂの５遺伝子が抽出された。これら抽出された計１６種の遺伝子及び比較対象であるＣＣＬ１７のＡＵＣ１、正答率１、参照値１、ＡＵＣ２、正答率２、参照値２、ＡＵＣ３を表３に示す。尚、表中の発現変化が「低下」とは重症度の悪化に伴い発現が低下することを、「上昇」とは重症度の悪化に伴い発現が上昇することを示す。

以上の結果から、ＣＩＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＣＴＳＺ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３、ＫＬＫ５、ＬＣＥ１Ｂ、ＳＰＲＲ１Ａ、ＰＫＰ１、ＫＲＴ７４、ＡＰＲＴ、ＫＲＴ２５及びＳ１００Ｂからなる１６種の遺伝子は、ＡＵＣ３がＣＣＬ１７のＡＵＣ３より高く、即ち高い精度で健常と軽中等度ＡＤの判別及び軽中等度ＡＤと重度ＡＤの判別のいずれをも行うことができる遺伝子であると考えられる。

[0071] [表3]

	発現変化	AUC1	正答率１	参照値１	AUC2	正答率２	参照値２	AUC3	順位
C1QB	上昇	0.843	0.74	6.657	0.756	0.797	8.991	0.800	1
DIAPH1	上昇	0.727	0.699	10.49	0.852	0.814	11.03	0.790	2
LCE1A	低下	0.708	0.685	11.35	0.857	0.797	8.494	0.783	3
CTSV	低下	0.775	0.781	11.09	0.777	0.746	9.229	0.776	4
CTSZ	上昇	0.785	0.781	11.41	0.734	0.712	12.17	0.760	5
KRT72	低下	0.698	0.644	11.75	0.807	0.763	8.507	0.753	6
SPINK5	低下	0.813	0.795	10.51	0.651	0.661	8.253	0.732	7
KRT23	低下	0.799	0.781	13.7	0.651	0.661	12.51	0.725	8
KLK5	低下	0.715	0.699	11.78	0.732	0.678	9.735	0.724	9
LCE1B	低下	0.737	0.685	11.64	0.71	0.678	9.983	0.724	9
SPRR1A	低下	0.72	0.685	14.42	0.708	0.661	12.57	0.714	11
PKP1	低下	0.713	0.726	10.68	0.714	0.712	9.757	0.714	12
KRT74	低下	0.675	0.671	7.902	0.751	0.729	5.442	0.713	13
APRT	上昇	0.719	0.658	8.707	0.7	0.695	9.245	0.710	14
KRT25	低下	0.709	0.671	11.94	0.689	0.678	9.34	0.699	15
S100B	上昇	0.664	0.671	8.971	0.731	0.729	10.06	0.698	16
CCL17	上昇	0.745	0.712	12.13	0.64	0.661	14.34	0.693	17

請求の範囲

[請求項1] 被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出するために、当該被験者から採取された生体試料について、Ｃ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＣＴＳＺ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３、ＫＬＫ５、ＬＣＥ１Ｂ、ＳＰＲＲ１Ａ、ＰＫＰ１、ＫＲＴ７４、ＡＰＲＴ、ＫＲＴ２５及びＳ１００Ｂからなる１６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遺伝子又はその発現産物の測定方法。

[請求項2] 前記遺伝子がＣ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＣＴＳＺ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３及びＫＬＫ５からなる９種の遺伝子群より選択される少なくとも１つの遺伝子である、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記遺伝子がＬＣＥ１Ａ、ＣＴＳＶ、ＫＲＴ７２、ＳＰＩＮＫ５、ＫＲＴ２３、ＫＬＫ５、ＬＣＥ１Ｂ、ＳＰＲＲ１Ａ、ＰＫＰ１、ＫＲＴ７４及びＫＲＴ２５からなる１１種の遺伝子群より選択される少なくとも１つの遺伝子であり、該遺伝子又はその発現産物の発現レベルが低いほど、前記被験者のアトピー性皮膚炎の重症度が高いと検出する、請求項１に記載の方法。

[請求項4] 重症度が異なる２群を判別するための参照値をあらかじめ定めておき、アトピー性皮膚炎患者の遺伝子又はその発現産物の発現レベルが該参照値以上であればより重症度が低い群、該参照値以下であれば重症度が高い群であると判別する、請求項３記載の方法。

[請求項5] 前記遺伝子がＣ１ＱＢ、ＤＩＡＰＨ１、ＣＴＳＺ、ＡＰＲＴ及びＳ１００Ｂからなる５種の遺伝子群より選択される少なくとも１つの遺伝子であり、該遺伝子又はその発現産物の発現レベルが高いほど、前記被験者のアトピー性皮膚炎の重症度が高いと検出する、請求項１に記載の方法。

[請求項6] 重症度が異なる２群を判別するための参照値をあらかじめ定めておき、アトピー性皮膚炎患者の遺伝子又はその発現産物の発現レベルが該参照値以下であればより重症度が低い群、該参照値以上であれば重症度が高い群であると判別する、請求項５記載の方法。

[請求項7] 重症度が症状なし、軽中等度及び重度から選ばれる１以上である、請求項１～６のいずれか１項記載の方法。

[請求項8] 重症度が異なるアトピー性皮膚炎患者由来の標的遺伝子又はその発現産物の発現レベル及び健常人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構築した判別式に、被験者における標的遺伝子又はその発現産物の発現レベルの測定値を代入し、被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出する、請求項１に記載の方法。

[請求項9] 前記遺伝子又はその発現産物の発現レベルがｍＲＮＡの発現量である、請求項１～８のいずれか１項記載の方法。

[請求項10] 前記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１～９のいずれか１項記載の方法。

[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アトピー性皮膚炎の重症度を検出するための検査用キット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/017017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6851(2018.01)i; ***C07K 16/18***(2006.01)i; ***C12M 1/00***(2006.01)i; ***C12M 1/34***(2006.01)i; ***C12N 15/12***(2006.01)i
FI: C12Q1/6851 Z; C12N15/12; C07K16/18; C12M1/00 A; C12M1/34 F; C12M1/34 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/6851; C07K16/18; C12M1/00; C12M1/34; C12N15/12

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/221138 A1 (KAO CORPORATION) 04 November 2021 (2021-11-04) claims 5, 7, 11, examples, particularly, table A-1-2	1, 2, 5-11
Y	claims 5, 7, 11, examples, particularly tables A-1-2	1, 2, 5-11
Y	JP 2022-16416 A (KAO CORPORATION) 21 January 2022 (2022-01-21) claims, examples	1, 2, 5-11
Y	JP 2022-87074 A (KAO CORPORATION) 09 June 2022 (2022-06-09) claims, examples	1, 2, 5-11
Y	JP 2022-49694 A (KAO CORPORATION) 29 March 2022 (2022-03-29) claims, examples	1, 2, 5-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 July 2024	**30 July 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/017017

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

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

The measurement method set forth in claim 1 is specified by the feature of measuring an expression level of a gene alternatively selected from 16 genes in order to detect the degree of severity of atopic dermatitis of a subject. The genes share the technical feature of being able to be used as a marker for detecting the degree of severity of atopic dermatitis of a subject.

However, document 1 discloses C1QB as a detection marker of adult atopic dermatitis, of which RNA expression level increases in a subject with mild or moderate atopic dermatitis compared to healthy subjects. The technical feature therefore cannot be considered to be a special technical feature.

Thus, the inventions in claims 1, 2 and 5-11 pertaining to the first alternative C1QB are classified as invention 1.

The inventions pertaining to DIAPH1-S100B are similarly respectively classified as inventions 2-16.

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

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☑ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Parts of inventions in claims 1, 2 and 5-11 pertaining to C1QB**

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/017017

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2021/221138 A1	04 November 2021	US 2023/0235399 A1 claims 5, 7, examples, particularly, table A-1-2 EP 4144862 A1 CN 115485390 A	
JP 2022-16416 A	21 January 2022	US 2023/0265515 A1 claims, examples WO 2022/009988 A1 EP 4180536 A1 CN 115803450 A	
JP 2022-87074 A	09 June 2022	US 2024/0018593 A1 claims, examples WO 2022/114200 A1 EP 4253547 A1 CN 116635526 A	
JP 2022-49694 A	29 March 2022	US 2024/0011093 A1 claims, examples WO 2022/059745 A1 EP 4215622 A1 CN 116194595 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/017017

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q 1/6851(2018.01)i; C07K 16/18(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/34(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i
FI: C12Q1/6851 Z; C12N15/12; C07K16/18; C12M1/00 A; C12M1/34 F; C12M1/34 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q1/6851; C07K16/18; C12M1/00; C12M1/34; C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2021/221138 A1 (花王株式会社) 04.11.2021 (2021-11-04) 請求項５、７、１１、実施例、特に表A-1-2	1, 2, 5-11
Y	請求項５、７、１１、実施例、特に表A-1-2	1, 2, 5-11
Y	JP 2022-16416 A (花王株式会社) 21.01.2022 (2022-01-21) 特許請求の範囲、実施例	1, 2, 5-11
Y	JP 2022-87074 A (花王株式会社) 09.06.2022 (2022-06-09) 特許請求の範囲、実施例	1, 2, 5-11
Y	JP 2022-49694 A (花王株式会社) 29.03.2022 (2022-03-29) 特許請求の範囲、実施例	1, 2, 5-11

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
22.07.2024	30.07.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
斉藤　貴子 4N 4509
電話番号 03-3581-1101 内線 3891

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/017017

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項１に記載の測定方法は、被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出するために、１６種の遺伝子から択一的に選択される遺伝子の発現レベルを測定することにより特定されたものであり、これらの遺伝子は、被験者におけるアトピー性皮膚炎の重症度を検出するためのマーカーとして使用できる点で共通する技術的特徴を有する。

しかしながら、文献１には、健常者と比較して、軽症又は中等症のアトピー性皮膚炎を有する被験者においてＲＮＡ発現量が上昇する、成人アトピー性皮膚炎の検出マーカーとしてＣ１ＱＢが記載されているから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。

したがって、請求項１、２、５－１１に係る発明のうち、最初の選択肢であるＣ１ＱＢに係る発明を発明１に区分する。

同様にＤＩＡＰＨ１～Ｓ１００Ｂに係る発明ついても、それぞれ発明２～１６に区分する。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☑ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。 請求項１、２、５－１１に係る発明のうち、Ｃ１ＱＢに係る部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/017017

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2021/221138 A1	04.11.2021	US 2023/0235399 A1 請求項５、７、実施例、特に表A-1-2 EP 4144862 A1 CN 115485390 A	
JP 2022-16416 A	21.01.2022	US 2023/0265515 A1 特許請求の範囲、実施例 WO 2022/009988 A1 EP 4180536 A1 CN 115803450 A	
JP 2022-87074 A	09.06.2022	US 2024/0018593 A1 特許請求の範囲、実施例 WO 2022/114200 A1 EP 4253547 A1 CN 116635526 A	
JP 2022-49694 A	29.03.2022	US 2024/0011093 A1 特許請求の範囲、実施例 WO 2022/059745 A1 EP 4215622 A1 CN 116194595 A	