

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6530717号

(P6530717)

(45) 発行日 令和1年6月12日 (2019.6.12)

(24) 登録日 令和1年5月24日 (2019.5.24)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68
C 1 2 Q 1/6827 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6827 Z
C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6806 Z
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813 Z
C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6876 Z

請求項の数 11 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-558170 (P2015-558170)	(73) 特許権者	508128082
(86) (22) 出願日	平成26年2月14日 (2014.2.14)		ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ
(65) 公表番号	特表2016-509833 (P2016-509833A)		テイ・オブ・コロラド、ア・ボディー・コ
(43) 公表日	平成28年4月4日 (2016.4.4)		ーポレイト
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/016601		アメリカ合衆国、コロラド・80203、
(87) 国際公開番号	W02014/127290		デンバー、グラント・ストリート・180
(87) 国際公開日	平成26年8月21日 (2014.8.21)		0、エイス・フロア
審査請求日	平成29年2月13日 (2017.2.13)	(74) 代理人	110001173
(31) 優先権主張番号	61/764, 986		特許業務法人川口国際特許事務所
(32) 優先日	平成25年2月14日 (2013.2.14)	(72) 発明者	シュワーツ, ディビッド・エイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、コロラド・80209、
			デンバー、サウス・ジャクソン・ストリー
			ト・110・ナンバー・2・ディー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 間質性肺炎の危険性を予測するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト対象が、間質性肺疾患に罹患しているか、またはそれを発症する危険性があるかどうかを決定するための方法であって、前記対象からの生体試料中の、

a) rs 3778337 における A 対立遺伝子及び rs 10484326 における C 対立遺伝子から成る群から選択される、少なくとも1つの遺伝的変異体の存在、及び

b) デスモプラキン (DSP) と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子の増加した遺伝子発現のレベル、

のうちの少なくとも1つを検出することを含み、前記少なくとも1つの遺伝的変異体及び/もしくは前記マーカー遺伝子の増加した遺伝子発現が、前記対象が間質性肺疾患に罹患しているか、またはそれを発症する危険性があることを示す、前記方法。

【請求項 2】

前記少なくとも1つの遺伝的変異体及び/もしくは前記マーカー遺伝子の増加した遺伝子発現が決定され、標準レベルまたは参照集合と比較される、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 3】

遺伝的変異体の前記存在が、PCR によって決定される、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 4】

前記遺伝的変異体の前記存在またはマーカー遺伝子の発現レベルが、前記生体試料からの RNA を得、前記 RNA から cDNA を生成し、前記 cDNA を増幅し、前記増幅され

10

20

た c D N A から前記生体試料中の前記マーカー遺伝子の前記発現レベルを得ることによって決定される、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 5】

ヒト対象における間質性肺疾患の進行を監視するための方法であって、

i) 前記対象から得られる第 1 の生体試料中の複数の遺伝子マーカーの発現レベルを測定することであって、前記複数のマーカーが、

a) D S P 及び、

D I S P 2、M A P T、D P P 9、C S M D 1、M Y N N、L R R C 3 4、F A M 1 3 A、O B F C 1、T O L L I P、A T P 1 1 A、I V D、C R H R 1、I M P 5、L O C 1 0 0 1 2 8 9 7 7、K I A A 1 2 6 7、N S F、W N T 3 及び C 1 7 o r f 6 9 から成る群から選択される少なくとも 1 つの配列と

少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するマーカー遺伝子
を測定することと、

i i) 前記対象から得られる第 2 の生体試料中の前記複数のマーカーの発現レベルを測定することと、

i i i) 前記第 1 の試料中で測定される前記マーカーの前記発現レベルを前記第 2 の試料中で測定される前記マーカーの前記レベルと比較することと、を含む、前記方法。

【請求項 6】

前記対象からの胸部の C T スキャン及び肺組織の病理検査から成る群から選択されるステップをさらに含む、請求項 5 に記載の前記方法。

【請求項 7】

少なくとも 1 つのさらなる時点で、前記対象から得られる少なくとも 1 つのさらなる生体試料中の前記複数のマーカーの前記発現レベルを測定することと、前記第 1 及び第 2 の試料中で測定される前記マーカーの前記発現レベルを、前記少なくとも 1 つのさらなる試料中で測定される前記マーカーの前記レベルと比較することと、をさらに含む、請求項 5 に記載の前記方法。

【請求項 8】

間質性肺疾患を予測するまたは診断するためのキットであって、r s 2 0 7 6 2 9 5、r s 3 7 7 8 3 3 7 及び r s 1 0 4 8 4 3 2 6 から成る群から選択される D S P における遺伝的変異体を検出するための、少なくとも 1 つの核酸プローブまたはプライマーを含む
、前記キット。

【請求項 9】

D S P 及び、

D I S P 2、M A P T、D P P 9、C S M D 1、M Y N N、L R R C 3 4、F A M 1 3 A、O B F C 1、T O L L I P、A T P 1 1 A、I V D、C R H R 1、I M P 5、L O C 1 0 0 1 2 8 9 7 7、K I A A 1 2 6 7、N S F、W N T 3、及び C 1 7 o r f 6 9 から成る群から選択される少なくとも 1 個の遺伝子の

遺伝的変異体を検出するための核酸プローブまたはプライマーを含む、請求項 8 に記載の前記キット。

【請求項 10】

前記選択される遺伝的変異体の位置にまたがる核酸を増幅する P C R プライマーを含む、請求項 8 に記載の前記キット。

【請求項 11】

フェルスタ (F o e r s t e r) 共鳴エネルギー移動 (F R E T) アクセプターで標識された 1 個のプローブまたはプライマーと、F R E T ドナーで標識された 1 個のプローブまたはプライマーを含む、請求項 8 に記載の前記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

10

20

30

40

50

本出願は、2013年2月14日に出願された米国仮特許出願第61/764986号に対する優先権を主張し、その開示は全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府支援に関する記述

本発明は、National Heart, Lung and Blood Instituteより与えられた助成金番号R01-HL095393、R01-HL097163、P01-HL092870、RC2-HL101715、U01-HL089897、U01-HL089856、U01-HL108642、及びP50-HL0894932、ならびにVeterans Administrationより与えられた助成金番号1I01BX001534のもと、政府の支援を受けて行われた。政府は、本発明

10

【0003】

本開示は、概して、間質性肺疾患に罹患しているか、またはその疑いがある個体の予後を特定及び評価するためのバイオマーカー、方法、及びアッセイキットに関する。

【背景技術】

【0004】

特発性間質性肺炎（IIP）は、肺線維症または肺胞間質の進行性瘢痕によって一般的に特徴付けられる肺疾患の一群を表し、低酸素呼吸不全による著しい罹患率及び死亡率をもたらす。肺線維症のいくつかの形態は、既知の環境曝露（例えば、アスベスト）、薬物毒性、放射線被曝、または膠原血管病（例えば、強皮症）に関連付けられるが、IIPは、既知の病因を有しない。最も一般的かつ重篤なIIPは、診断後、2～3年の生存期間中央値を有する特発性肺線維症（IPF）である。米国における使用が認可されたIPFの薬理的療法は存在せず、肺移植が、延命するための唯一の治療介入である。全てのIIPは、変わりやすい臨床経過を有するが、それらは、多くの場合、末期の肺疾患まで進行し、死亡する。IIPの危険性は、複数の遺伝的変異体及び環境毒素によって決定され得るように見えるが、IIPの原因は、明らかになり始めたばかりである。

20

【0005】

間質性肺疾患の異なる組織型を示す、独立して、もしくは組み合わせて作用する遺伝的変異体の特定、ならびに間質性肺疾患と診断された、または間質性肺疾患を発症しやすい疑いのある個体においてこれらの遺伝的変異体を特定するための方法の必要性が存在する。これら及び当該技術分野における他の問題に対する解決策が、本明細書に提供される。

30

【発明の概要】

【0006】

対象（すなわち、個体）が、間質性肺炎（例えば、FIP、IPF、またはIIP）等の間質性肺疾患に罹患しているか、またはそれを発症する危険性があるかどうかを決定するための方法及び材料が、本明細書に提供される。また、間質性肺疾患と診断されるか、または罹患していると疑われる個体（例えば、間質性肺炎の家族の病歴を有する個体）の予後を決定する方法も提供される。いくつかの実施形態では、間質性肺疾患は、特発性肺線維症等の線維性間質性肺炎または家族性間質性肺炎である。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトである。

40

【0007】

また、間質性肺疾患に罹患しているヒト対象において遺伝的変異体（例えば、単一ヌクレオチド遺伝子多型）を検出する方法も本明細書に提供される。方法は、ヒト対象の生体試料中の以下に記載の遺伝子多型を検出することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、生体試料を得る及び/またはアッセイすることを含む。以下に記載されるように、いくつかの実施形態では、遺伝子多型は、rs868903、rs7934606、rs6421972、rs7480563、rs7942850、rs4077759、rs2334659、rs7122936、rs2301160、rs3829223、またはrs2857476である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異体は、表1及び2に列挙されるSNPのうちのいずれか1つから選択される。

50

【0008】

また、間質性肺疾患を治療する方法を必要とするヒト対象、例えば、本明細書に記載される方法を使用して、間質性肺疾患に罹患しているか、または恐らく罹患していると診断される対象におけるその方法も本明細書に提供される。方法は、ヒト対象の生体試料中の以下に記載される遺伝的変異体を検出することと、有効量の間質性肺疾患治療を施すことと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、生体試料を得る及び/またはアッセイすることを含む。以下に記載されるように、いくつかの実施形態では、遺伝的変異体は、遺伝子多型 rs 868903、rs 7934606、rs 6421972、rs 7480563、rs 7942850、rs 4077759、rs 2334659、rs 7122936、rs 2301160、rs 3829223、及び/または rs 2857476 である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異体は、表 1 及び 2 に列挙される SNP のうちのいずれか 1 つから選択される。

10

【0009】

本開示の 1 つの実施形態は、個体の生体試料中の 1 つ以上の遺伝的変異体（例えば、マーカー遺伝子または複数のマーカー遺伝子における遺伝子多型）を検出することを含む、方法に関する。遺伝子多型は、rs 2736100、rs 2076295、rs 3778337、rs 4727443、rs 868903、rs 7934606、rs 6421972、rs 7480563、rs 7942850、rs 4077759、rs 2334659、rs 7122936、rs 2034650、rs 1992272、rs 1981997、rs 17563986、rs 8070723、rs 12610495、rs 2109069、rs 1379326、rs 1881984、rs 10936599、rs 1997392、rs 6793295、rs 2609255、rs 2853676、rs 10484326、rs 10748858、rs 2067832、rs 11191865、rs 2301160、rs 3829223、rs 2857476、rs 1278769、rs 1007177、rs 10518693、rs 393152、rs 12373139、rs 17690703、rs 2532274、rs 2532269、rs 2668692、rs 169201、rs 199533、及び rs 415430 から選択される。

20

【0010】

関連実施形態では、遺伝子多型は、rs 2736100、rs 2076295、rs 3778337、rs 4727443、rs 868903、rs 7934606、rs 6421972、rs 7480563、rs 7942850、rs 4077759、rs 2334659、rs 7122936、rs 2034650、rs 1992272、rs 1981997、rs 17563986、rs 8070723、rs 12610495、及び rs 2109069 から成る群から選択される。いくつかの実施形態では、検出することは、任意の組み合わせで、これらの遺伝子多型の少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または 19 個を検出することを含む。

30

【0011】

関連実施形態では、遺伝子多型は、rs 868903、rs 7934606、rs 6421972、rs 7480563、rs 7942850、rs 4077759、rs 2334659、rs 7122936、rs 2301160、rs 3829223、及び rs 2857476 から成る群から選択される。いくつかの実施形態では、検出することは、任意の組み合わせで、これらの遺伝子多型の少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または 11 個を検出することを含む。

40

【0012】

関連実施形態では、遺伝子多型は、rs 2736100、rs 868903、rs 1881984、及び rs 2853676 から成る群から選択される。いくつかの実施形態では、検出することは、任意の組み合わせで、これらの遺伝子多型の少なくとも 1、2、3、または 4 個を検出することを含む。

【0013】

50

関連実施形態では、遺伝子多型は、rs 868903である。

【0014】

関連実施形態では、遺伝子多型は、rs 1379326、rs 1881984、rs 10936599、rs 1997392、rs 6793295、rs 2609255、rs 2853676、rs 10484326、rs 10748858、rs 2067832、rs 11191865、rs 2301160、rs 3829223、rs 2857476、rs 1278769、rs 1007177、rs 10518693、rs 393152、rs 12373139、rs 17690703、rs 2532274、rs 2532269、rs 2668692、rs 169201、rs 199533、及びrs 415430から成る群から選択される。いくつかの実施形態では、検出することは、任意の組み合わせで、これらの遺伝子多型の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29個を検出することを含む。

10

【0015】

関連実施形態では、方法は、個体からの生体試料中の1つ以上のさらなる遺伝子多型を検出することを含み、該遺伝子多型は、rs 35705950である。

【0016】

関連実施形態では、個体は、上述の遺伝子多型のうちの1つ以上に関してホモ接合型であってもよい。他の関連実施形態では、個体は、上述の遺伝子多型のうちの1つ以上に関してヘテロ接合型であってもよい。

20

【0017】

これらの実施形態の各々では、遺伝子多型のうちの少なくとも1つの検出は、間質性肺疾患を発症する変更された危険性を有する個体を示す（例えば、個体は、間質性肺疾患を発症する増加または低減した危険性を有する）。

【0018】

いくつかの実施形態では、個体は、散発性間質性肺疾患を発症する増加した危険性がある。いくつかの実施形態では、個体は、家族性間質性肺疾患を発症する増加した危険性がある。いくつかの実施形態では、個体は、特発性肺線維症（IPF）を発症する増加した危険性がある。他の実施形態では、個体は、散発性IIPを発症する低減した危険性がある。いくつかの実施形態では、個体は、家族性IIPを発症する低減した危険性がある。いくつかの実施形態では、個体は、特発性肺線維症（IPF）を発症する低減した危険性がある。

30

【0019】

これらの実施形態では、遺伝子多型のうちの少なくとも1つの検出は、個体の間質性肺疾患の進行を示し得る。いくつかの実施形態では、遺伝子多型のうちの少なくとも1つの検出は、個体における間質性肺疾患の進行の欠如または間質性肺疾患の緩徐な進行を示し得る。いくつかの実施形態では、遺伝子多型のうちの少なくとも1つの検出は、個体における間質性肺疾患の急速な進行を示し得る。

【0020】

これらの実施形態の各々では、遺伝子多型のうちの1つ以上の存在は、危険予測のための統計的手順に従って決定される、個体における、間質性肺疾患を発症する危険性、特定の間質性肺疾患の診断、間質性肺疾患の進行、間質性肺疾患の臨床転帰、または間質性肺疾患の治療に対する応答性と関連付けられた遺伝子多型の標準集合もしくは参照群等の対照と比較され得る。

40

【0021】

本方法の1つの実施形態では、遺伝子多型の存在は、個体からゲノムDNA試料を取得し、特定の遺伝子座における遺伝子多型の存在または不在を決定することによって、検出することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子多型の存在または不在は、遺伝子座特異多重PCR増幅、遺伝子座特異単位複製配列からの多重塩基伸長（SBE）、及びマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型（MALDI-TOF）質量分析を

50

使用したSBE産物の多重分解能法から選択される少なくとも1つの方法によって決定される。

【0022】

本方法の別の実施形態では、マーカーの存在は、生体試料（例えば、組織試料）からRNAを得て、そのRNAからcDNAを生成し、そのcDNAを、遺伝子多型を含有する遺伝的位置に対するプローブまたはプライマーで任意に増幅し、生体試料中の遺伝子多型のうちの少なくとも1つの存在または不在を決定することによって決定される。

【0023】

これらの方法は、生体試料中の遺伝子多型のうちの1つ以上の存在を、間質性肺疾患の発症または（例えば、安定したIIP疾患、または緩徐に、重度に、もしくは急速に進行するIIPのうちの1つを）診断された個体におけるその疾患の進行と相関性があった1つ以上の遺伝子多型（複数可）の標準集合と、または間質性肺疾患の未発症もしくは肺癆痕（線維症）等の疾患の病理学的症状の未発症と相関性があった1つ以上の遺伝子多型（複数可）の対照もしくは標準集合と比較することを含み得る。この実施形態では、1つ以上の遺伝子多型の存在が、間質性肺疾患を発症する危険性または間質性肺疾患疾患の進行の重症度もしくは度合いと相関性があった1つ以上の遺伝子多型（複数可）の標準集合と合致する場合、その個体は、間質性肺疾患もしくは間質性肺疾患疾患（肺癆痕（線維症））の病理学的兆候を発症するか、またはその発症を進行する（例えば、急速に、緩徐に進行する、もしくは進行しない）変更された危険性（例えば、増加または低減した危険性）にあると特定される。あるいは、1つ以上の遺伝子多型の存在が1つ以上の遺伝子多型（複数可）の標準集合と合致しない場合、個体は、低減した危険性を有するか、または間質性肺疾患疾患を発症しないか、または間質性肺疾患疾患の病理学的兆候を臨床的に進行しないことが予測され得る。

【0024】

個体が、間質性肺疾患を発症する増加または低減した危険性があるか、または肺癆痕（線維症）の発症を急速に進行する増加または低減した危険性があるかを決定するこれらの方法の実施形態は、表1及び2に列挙されるSNPのうちのいずれか1つ以上等の上に列挙された遺伝子多型（複数可）、例えば、rs35705950、rs868903、rs2736100、rs2853676、rs1881984、rs2736100、rs2609255、rs10484326、rs2076295、rs10748858、rs2067832、rs11191865、rs1278769、rs12610495、及びrs2109069から選択される少なくとも1つの遺伝子多型の存在を検出することを含む。遺伝子多型のうちの少なくとも1つの存在は、個体が肺癆痕（線維症）及び間質性肺疾患を発症するか、またはその発症を進行するか（例えば、急速に進行する）どうかを示す。

【0025】

これらの実施形態は、臨床評価、胸部のコンピューター断層撮影像（胸部のCTスキャン）、及び放射線技師による検査等の個体の経過観察ステップを実施することを含み得る。

【0026】

本開示の別の実施形態は、間質性肺疾患と診断される個体における治療（例えば、緩和療法または肺移植）の必要性を予測するためのアッセイシステムである。アッセイシステムは、rs35705950、rs868903、rs2736100、rs2853676、rs1881984、rs2736100、rs2609255、rs10484326、rs2076295、rs10748858、rs2067832、rs11191865、rs1278769、rs12610495、及びrs2109069から成る群から選択される少なくとも1つの遺伝子多型の存在を検出するための手段を含む。アッセイシステムの1つの実施形態では、遺伝子多型を検出するための手段は、遺伝子多型を含む核酸配列の少なくとも10～50個の隣接する核酸を有する核酸プローブを含む。核酸プローブは、好ましくは、チップ、アレイ、または流動性カードを含み得る、アッ

10

20

30

40

50

セイ表面上に配置される。アッセイシステムは、間質性肺疾患を発症する危険性、または間質性肺疾患患者における間質性肺疾患の進行または増加もしくは減少した平均余命と相関性があった事前決定される遺伝子多型または遺伝子多型の集合を含有する情報から選択される対照を含んでもよい。

【0027】

本開示の実施形態のうちのいずれか1つでは、検出するステップは、遺伝子多型を含む少なくとも1つの遺伝的位置にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを使用することを含み得るが、これに限定されない。1つの態様では、プローブは、キメラプローブ（例えば、遺伝子多型位置の2つ以上にハイブリダイズするもの）であってもよい。別の態様では、検出するステップは、生体試料中の1つ以上の細胞中の遺伝子多型のコピーの数を検出すること（すなわち、個体が、遺伝子多型のヘテロ接合型またはホモ接合型であるかどうかを決定すること）を含み得る。

10

【0028】

本実施形態の1つの態様では、比較するステップは、生体試料中の遺伝子多型のうちの1つ以上の存在を、急速に進行する間質性肺疾患に罹患している患者からの遺伝子多型の対照集合と、または間質性肺疾患の緩徐な進行を有する、もしくは進行がない患者からの遺伝子多型の対照集合と比較することを含む。

【0029】

本開示の実施形態のうちのいずれか1つでは、個体は、個体の肺組織における組織学的外見及び/またはマーカー（複数可）を含む臨床共変量の評価を通して、それらの間質性肺疾患を発症する危険性または診断もしくは予後診断（例えば、肺瘢痕等の間質性肺疾患の病理学的特性が進行しないか、または緩徐もしくは急速に進行することが予測されるかどうか）のために選択され得る。

20

【0030】

また、間質性肺疾患に罹患しているヒト対象における1つ以上のマーカー遺伝子（例えば、バイオマーカー）の発現のレベルを検出する方法も本明細書に提供される。方法は、ヒト対象の生体試料中で、後述される1つ以上のマーカー遺伝子のレベルを検出することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、生体試料を得る及び/またはアッセイすることを含む。以下に記載されるように、いくつかの実施形態では、マーカー遺伝子は、TERT、MUC2、TOLLIP、DSP、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、またはそれらの相同体もしくは変異体である。いくつかの実施形態では、マーカー遺伝子は、TERT、MUC2、TOLLIP、相同体、及びそれらの変異体から選択される。

30

【0031】

また、間質性肺疾患を治療する方法を必要とする対象におけるその方法も本明細書に提供される。方法は、ヒト対象の生体試料中の後述の1つ以上のマーカー遺伝子のレベルを検出することと、有効量の間質性肺疾患治療を施すことと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、生体試料を得る及び/またはアッセイすることを含む。以下に記載されるように、いくつかの実施形態では、マーカー遺伝子は、TERT、MUC2、TOLLIP、DSP、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、またはそれらの相同体もしくは変異体である。

40

【0032】

本開示の1つの実施形態は、個体からの生体試料中でマーカー遺伝子または複数のマーカー遺伝子の遺伝子発現（例えば、RNAまたはタンパク質の発現）のレベルを検出することを含む方法に関する。マーカー遺伝子（複数可）は、TERT（テロメラーゼ逆転写酵素；NC_000005.9；AY407349）；TOLLIP（tol1相互作用

50

タンパク質；NC__000011.9；AY419805）、MUC2（ムチン2、オリゴマー粘液/ゲル形成；NC__000011.9；DQ036653）、DSP（デスモプラキン；NC__000006.11；DQ030635）、DISP2（ディスパッチド（dispatched）相同体2；NC__000015.9）、MAPT（微小管関連タンパク質tau；NC__000017.10；AY413628）、DPP9（ジペプチジル-ペプチダーゼ9；NC__000019.9；DQ053109）、CSMD1（CUB及びSushi多重ドメイン1；NC__000008.10；DQ037810）、MYNN（ミオネウリン（myoneurin）；NC__000003.11；AY407169）、LRRC34（ロイシンリッチリピート含有34；NC__000003.11）、FAM13A（配列類似性を有するファミリー13、メンバーA；NC__000004.11）、OBFC1（オリゴヌクレオチド/オリゴ糖結合フォールド含有1；NC__000010.10）、ATP11A（ATPase、クラスVI、タイプ11A；NC__000013.10）、IVD（イソバレリル-CoA脱水素酵素；NC__000015.9；AY418331）、CRHR1（副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンアセプター1；NC__000017.10；AY414327）、IMP5（インポーチン5；NC__000013.10）、LOC100128977（MAPTアンチセンスRNA1；NC__000017.10）、KIAA1267（KAT8制御性NSL複合体サブユニット1；NC__000017.10；NG__032784）、NSF（N-エチルマレイミド感受性因子；NC__000017.10）、WNT3（ウイングレス型MMTV組み込み部位ファミリー、メンバー3；NC__000017.10；AY413892）、C17orf69（CRHR1イントロン転写物1（非タンパク質コーディング；NC__000017.10）から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子から選択される。いくつかの実施形態では、マーカー遺伝子は、選択される遺伝子の少なくとも10、15、20、25、30、50、70、80、100、200個、またはそれ以上の隣接するヌクレオチドのスパンにわたって少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、マーカー遺伝子が、選択されるマーカー遺伝子とはっきり異なるが、同じ遺伝的変異を含む上述のうちの少なくとも1つの相同体または変異体である。

【0033】

関連実施形態では、マーカー遺伝子（複数可）は、MUC5Bを含む複数のマーカー遺伝子から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子ならびにTERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69から成る群から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性（例えば、少なくとも10、15、20、25、30、50、70、80、100、200個、またはそれ以上の隣接するヌクレオチドのスパンにわたって少なくとも96、97、98、99、または100%の同一性）を有する少なくとも1つのマーカー遺伝子から選択される。この場合もやはり、マーカー遺伝子は、同じ遺伝的変異体を含む選択されるマーカー遺伝子の相同体または変異体であってもよい。

【0034】

関連実施形態では、マーカー遺伝子（複数可）は、TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、またはそれらの相同体もしくは変異体の遺伝子集合を含む複数のマーカー遺伝子から選択される配列と少なくとも10、15、20、25、30、50、70、80、100、200個、またはそれ以上の隣接するヌクレオチドのスパンにわたって少なくとも95%の配列同一性（例えば、少なくとも96、97、98、99、または100%の同一性）を有するマーカー遺伝子から選択される。関連実施形態では、マーカー遺伝子（複数可）は、TERT、MUC2、TOLLIP、またはそれらの相同体もしくは変異体の遺伝子集合を含む複数のマーカー遺伝子から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子から選択される。

【0035】

関連実施形態では、マーカー遺伝子（複数可）は、TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、またはそれらの相同体もしくは変異体の遺伝子集合を含む複数のマーカー遺伝子から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性（例えば、少なくとも96、97、98、99、または100%の同一性）を有するマーカー遺伝子から選択される。関連実施形態では、方法は、個体からの生体試料中の1つ以上のさらなるマーカー遺伝子の遺伝子発現（例えば、RNAまたはタンパク質の発現）のレベルを検出することをさらに含み得る。さらなるマーカー遺伝子（複数可）は、MUC5BならびにTERC、SFTPC、及びSFTPA2から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性（例えば、少なくとも96、97、98、99、または100%の同一性）を有するマーカー遺伝子から選択される。関連実施形態では、さらなるマーカー遺伝子は、MUC5Bである。

10

【0036】

関連実施形態では、マーカー遺伝子（複数可）の発現のレベルの検出は、マーカー遺伝子及び/もしくはそのマーカー遺伝子のポリペプチドの断片でコードされたポリペプチド、ならびに/またはマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチド（例えば、mRNA）の検出によって行われ得る。

【0037】

いくつかの実施形態では、マーカーの増加した遺伝子発現の検出は、個体が、間質性肺疾患を発症する増加した危険性を有することを示す。いくつかの実施形態では、個体は、散発性IIPを発症する危険性がある。いくつかの実施形態では、個体は、家族性IIPを発症する危険性がある。いくつかの実施形態では、個体は、特発性肺線維症（IPF）を発症する危険性がある。

20

【0038】

いくつかの実施形態では、これらの方法において検出される遺伝子は、対応するマーカー遺伝子と100%の配列同一性を共有する。

【0039】

これらの実施形態の各々では、複数のマーカーのうちの少なくとも1つのレベルは、決定され、危険予測のための統計的手順に従って決定され得る遺伝子発現の標準レベルまたは参照範囲と比較され得る。

30

【0040】

本方法の1つの実施形態では、ポリペプチドの存在は、そのポリペプチドまたはその断片に特異的に結合する試薬を使用して検出され得る。1つの実施形態では、試薬は、抗体、抗体誘導体、及び抗体断片から成る群から選択される。

【0041】

本方法の別の実施形態では、マーカーの存在は、対象の組織試料からRNAを得、そのRNAからcDNAを生成し、そのcDNAをマーカー遺伝子に対するプローブまたはプライマーで増幅し、増幅されたcDNAから試料中の遺伝子または遺伝子発現産物の発現レベルを得ることによって、決定される。

40

【0042】

これらの方法は、生体試料中のマーカー遺伝子または複数のマーカー遺伝子の発現レベルを、間質性肺疾患の診断、またはその発症もしくは進行と相関性があったマーカー遺伝子の対照レベルを含むマーカー遺伝子（複数可）の対照レベルと比較することを含み得る。これらの実施形態では、間質性肺疾患の発生率、または間質性肺疾患の発症もしくは進行性の間質性肺疾患と相関性があったマーカー遺伝子の発現の対照レベルと統計的に同様もしくはそれを上回る場合、個体は、間質性肺疾患（肺瘢痕（線維症）等）の病理学的兆候を発症または進行することが予測される。あるいは、個体の生体試料中のマーカー遺伝子のレベルが、間質性肺疾患の発生率、または間質性肺疾患の発症もしくは進行性間質性

50

肺疾患と相関性があったマーカー遺伝子の対照レベルを統計的に下回る場合、個体は、間質性肺疾患を発症しないことが予測されるか、または間質性肺疾患の発症を進行しない、もしくは緩徐に進行することが予測され得る。

【 0 0 4 3 】

さらに、または代替として、これらの実施形態は、生体試料中のマーカー遺伝子または複数のマーカー遺伝子の発現レベルを、間質性肺疾患を発症したか、または進行性の間質性肺疾患に罹患した第2の個体中のマーカー遺伝子（複数可）のレベルと比較することを含み得る。この実施形態では、個体の生体試料中のマーカー遺伝子の発現レベルが、第2の個体中のマーカー遺伝子（複数可）の発現のレベルと統計的に同様もしくはそれを上回る場合、個体は、間質性肺疾患を発症するか、または進行性の間質性肺疾患に罹患することが予測される。あるいは、個体の生体試料中のマーカー遺伝子のレベルが、第2の個体中のマーカー遺伝子（複数可）の発現のレベルを下回る場合、個体は、間質性肺疾患を発症しないか、または進行性の間質性肺疾患に罹患していないことが予測される。

10

【 0 0 4 4 】

個体が肺瘢痕（線維症）及び間質性肺疾患を発症するか、またはそれらの発症を急速に進行するかどうかを決定するこれらの方法の実施形態は、個体からの生体試料中のMUC5B、DSP、及びDPP9、またはそれらの相同体もしくは変異体のそれぞれと少なくとも95%の配列同一性を有する遺伝子の遺伝子発現のレベルを検出することを含む。いくつかの実施形態では、検出される遺伝子は、好ましくは、対応するマーカー遺伝子と100%の配列同一性を共有する。方法は、遺伝子によってコードされるポリペプチド及び/もしくはポリペプチドの断片、ならびに/または遺伝子に完全に相補的であるポリヌクレオチドのレベルを検出することによっても行うことができる。この実施形態では、複数のマーカーの発現の増加したレベルは、個体が肺瘢痕（線維症）及び間質性肺疾患を発症するか、またはそれらの発症を急速に進行するかどうかを示す。

20

【 0 0 4 5 】

本開示の別の実施形態は、対象から得られる第1の生体試料中の上に示される1つ以上の（例えば、複数の）マーカー遺伝子の発現レベルを測定し、その発現レベルを対照と比較することによって、対象における間質性肺疾患の進行を監視する方法である。関連実施形態では、方法は、対象から得られる第1の生体試料中の複数のマーカー遺伝子の発現レベルを測定し、対象から得られる第2の生体試料中の複数のマーカーのレベルを測定し、第1の試料中で測定されるマーカーのレベルを、第2の試料中で測定されるマーカーのレベルと比較することによって、対象における間質性肺疾患の進行を監視することを提供する。この実施形態では、複数のマーカー遺伝子（複数可）は、上に示されるマーカー遺伝子から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子から選択される。あるいは、この実施形態では、複数のマーカー遺伝子（複数可）は、MUC5B、DSP、及びDPP9、またはそれらの相同体もしくは変異体から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子から選択される。好ましくは、第2の生体試料は、第1の生体試料が得られた後の時点で対象から得られる。あるいは、第1の生体試料及び第2の生体試料は、様々な時点にわたって2回以上対象から得られる。

30

【 0 0 4 6 】

関連実施形態では、マーカー遺伝子（複数可）の発現のレベルの検出は、マーカー遺伝子でコードされたポリペプチド及び/もしくはマーカー遺伝子のポリペプチドの断片、ならびに/またはマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチドの検出によって行われ得る。いくつかの実施形態では、これらの方法において検出される遺伝子は、対応するマーカー遺伝子と100%の配列同一性を共有する。

40

【 0 0 4 7 】

これらの実施形態は、胸部のコンピューター断層撮影像（胸部のCTスキャン）及び放射線技師による検査等の経過観察ステップを実施することを含み得る。

【 0 0 4 8 】

本開示の別の実施形態は、対象から得られる第1の試料中で測定される遺伝子マーカー

50

の発現のレベルを、間質性肺疾患の発症または進行に関連付けられる対照値と比較することによって、対象における間質性肺疾患に対する治療の効能を評定する方法である。本開示の別の実施形態は、対象から得られる第1の試料中で測定される遺伝子マーカーの発現のレベルを、後の時点で対象から得られる第2の試料中の遺伝子マーカーの発現レベルと比較すること、ならびに胸部のコンピューター断層撮影像（胸部のCTスキャン）または放射線技師による肺試料の検査等の経過観察ステップを実施することによって、対象における間質性肺疾患に対する治療の効能を評定する方法である。この実施形態では、第1の試料と比べた第2の試料中のマーカーのレベルの減少は、治療が対象における間質性肺疾患の治療に効果的であることの兆候である。いくつかの実施形態では、第1の試料は、治療が対象に施される前に採取され、第2の試料は、治療が対象に施された後に得られる。別の実施形態では、試料は、様々な時点にわたって得られ、比較は繰り返される。この実施形態では、複数のマーカー遺伝子（複数可）は、上に記載されるマーカー遺伝子から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子から選択される。あるいは、この実施形態では、複数のマーカー遺伝子（複数可）は、MUC5B、DSP、及びDPP9またはそれらの相同体もしくは変異体から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子から選択される。

【0049】

関連実施形態では、マーカー遺伝子（複数可）の発現のレベルの検出は、マーカー遺伝子でコードされたポリペプチド及び/もしくはマーカー遺伝子のポリペプチドの断片、ならびに/またはマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチドの検出によって行われ得る。いくつかの実施形態では、これらの方法において検出される遺伝子は、対応するマーカー遺伝子と100%の配列同一性を共有する。

【0050】

本開示の別の実施形態は、間質性肺疾患と診断される個体における肺移植の必要性を予測するためのアッセイシステムである。アッセイシステムは、MUC5B、DSP、及びDPP9、またはそれらの相同体もしくは変異体から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子または複数のマーカー遺伝子の発現を検出するための手段を含む。いくつかの実施形態では、これらの方法において検出される遺伝子は、対応するマーカー遺伝子と100%の配列同一性を共有する。

【0051】

アッセイシステムの1つの実施形態では、検出するための手段は、マーカー遺伝子（複数可）の少なくとも10～50個（例えば、10、15、20、25、30、10～50、20～40、10～100、50～100等）の隣接する核酸、またはそれらの相補的核酸配列を有する核酸プローブを含む。アッセイシステムの別の実施形態では、検出するための手段は、マーカー遺伝子によってコードされるポリペプチドを特異的に検出する結合リガントを含む。これらの結合リガントは、抗体、抗原結合抗体誘導体、または抗原結合抗体断片を含み得る。核酸プローブ及び/または結合リガントは、ビーズ、微小流体表面、チップ、アレイ、または流動性カード等のアッセイ表面上に配置することができる。

【0052】

アッセイシステムは、間質性肺疾患患者の進行または平均余命と相関性があったマーカー遺伝子の事前決定される対照レベルを含有する情報から選択される対照を含んでもよい。

【0053】

本開示の実施形態のうちのいずれか1つでは、検出するステップは、マーカー遺伝子（複数可）のうちの少なくとも1つにハイブリダイズするヌクレオチドプローブを使用することを含むことができるが、これに限定されない。1つの態様では、プローブは、キメラプローブ（例えば、2個以上のバイオマーカー遺伝子にハイブリダイズするもの）であってもよい。別の態様では、検出するステップは、生体試料中の1つ以上の細胞中の細胞1個当たりのバイオマーカー遺伝子のコピーの数を検出すること、及び/または生体試料中の1つ以上の細胞中の細胞1個当たりのマーカー遺伝子増幅を検出することを含む得る。

実施形態では、遺伝子発現を検出するステップは、その各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,514,750号及び同第6,942,837号及び同第7,211,443号及び同第7,235,406号に記載されるTaqMan（登録商標）Gene Signature Arrayによって実施され、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0054】

本実施形態の1つの態様では、比較するステップは、生体試料中のバイオマーカーレベルを、間質性肺疾患を急速に進行する患者からの1つ以上の対照試料中のバイオマーカーの対照レベルと比較することを含む。1つの態様では、バイオマーカーの対照レベルは、間質性肺疾患の緩徐な進行または未進行と相関性があったレベルである。

10

【0055】

本開示の実施形態のうちのいずれか1つでは、間質性肺疾患を発症するか、または進行性の間質性肺疾患に罹患していることが予測される個体の選択は、個体の肺組織における組織学的外見及び/またはマーカー（複数可）を含む、臨床的共変量の評価を含み得る。

【0056】

ヒト対象が、間質性肺疾患に罹患しているか、またはそれを発症する危険性があるかどうかを決定するための方法であって、対象からの生体試料中の、のうちの少なくとも1つ：

a) rs2736100、rs2076295、rs3778337、rs4727443、rs868903、rs7934606、rs6421972、rs7480563、rs7942850、rs4077759、rs2334659、rs7122936、rs2034650、rs1992272、rs1981997、rs17563986、rs8070723、rs12610495、rs2109069、rs1379326、rs1881984、rs10936599、rs1997392、rs6793295、rs2609255、rs2853676、rs10484326、rs10748858、rs2067832、rs11191865、rs2301160、rs3829223、rs2857476、rs1278769、rs1007177、rs10518693、rs393152、rs12373139、rs17690703、rs2532274、rs2532269、rs2668692、rs169201、rs199533、及びrs415430から成る群から選択される遺伝的変異体の存在、
b) TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、またはそれらの相同体もしくは変異体から成る群から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子から成る群から選択されるマーカー遺伝子または複数のマーカー遺伝子の遺伝子発現のレベル、
c) b)の前記マーカー遺伝子によってコードされるポリペプチド、
d) c)のポリペプチドの断片、ならびに
e) b)のマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチド、

20

30

のうちの少なくとも1つを検出することを含み、少なくとも1つの遺伝的変異体、ポリペプチド、断片、及び/もしくは相補的ポリヌクレオチドの存在、ならびに/または前記マーカー遺伝子の増加もしくは低減した遺伝子発現が、対象が間質性肺疾患に罹患しているか、またはそれを発症する危険性があることを示す方法が、さらに提供される。いくつかの実施形態では、遺伝的変異体の存在は、PCRによって決定される。いくつかの実施形態では、遺伝的変異体の存在は、フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）の検出によって決定される。いくつかの実施形態では、遺伝的変異体の存在は、例えば、ポリペプチドに特異的な抗体、抗原結合抗体誘導体、及び抗原結合抗体断片を使用して、ポリペプチドの存在または発現レベルを検出することによって、決定される。いくつかの実施形態では、間質性肺疾患は、線維性肺疾患、特発性肺線維症（IPF）、家族性間質性肺炎（FIP）、または特発性間質性肺炎（IIP）である。

40

50

【 0 0 5 7 】

また、ヒト対象における間質性肺疾患の進行を監視するための方法であって、i) 対象から得られる第1の生体試料中の複数の遺伝子マーカーの発現レベルを測定することであって、複数のマーカーが、

a) TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、または相同体またはそれらの変異体から成る群から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子、

b) a) のマーカー遺伝子によってコードされるポリペプチド、

c) b) のポリペプチドの断片、及び

d) a) のマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチド、から成る群から選択される複数のマーカーを含む、測定することと、

ii) 前記対象から得られる第2の生体試料中の前記複数のマーカーの発現レベルを測定することと、

iii) 第1の試料中で測定されるマーカーの発現レベルを第2の試料中で測定されるマーカーのレベルと比較することと、を含む、方法も提供される。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも1つのさらなる時点で対象から得られる少なくとも1つのさらなる生体試料中の複数のマーカーの発現レベルを測定することと、第1及び第2の試料中で測定されるマーカーの発現レベルを、少なくとも1つのさらなる試料中で測定されるマーカーのレベルと比較することと、をさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、第2の試料中のマーカーの発現レベルが第1の試料のものよりも高い場合、間質性肺疾患の治療を推奨することをさらに含む。いくつかの実施形態では、間質性肺疾患は、線維性肺疾患、特発性肺線維症 (IPF)、家族性間質性肺炎 (FIP)、または特発性間質性肺炎である。

【 0 0 5 8 】

また、ヒト対象における間質性肺疾患の治療の効能を評定する方法であって、

t₀ 時点で対象から得られる第1の試料中で測定されるマーカーの発現レベルを決定することであって、マーカーが、

a) TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、またはそれらの相同体もしくは変異体から成る群から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子、

b) a) の前記マーカー遺伝子によってコードされるポリペプチド、

c) b) のポリペプチドの断片、及び

d) a) のマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチド、から成る群から選択される、決定することと、

ii) 後の t₁ 時点で前記対象から得られる第2の試料中の前記マーカーの前記発現レベルを決定することと、

iii) 胸部のCTスキャンを実施すること及び前記対象からの肺組織の病理検査を実施することから選択される経過観察ステップを実施することと、を含み、第1の試料と比べた第2の試料中のマーカーの発現レベルの減少が、治療が対象における間質性肺疾患の治療に効果的であることの兆候である、方法も提供される。いくつかの実施形態では、t₀ 時点は、治療が対象に施される前であり、t₁ 時点は、治療が対象に施された後である。いくつかの実施形態では、t₀ 時点は、治療が対象に施された後であり、t₁ 時点は、治療が対象に施された後の t₀ 時点よりも後である。いくつかの実施形態では、治療は、複数回施される。いくつかの実施形態では、比較することは、様々な時点にわたって対象から得られる生体試料に対して繰り返される。

ヒト対象における間質性肺疾患のための療法への応答を予測するためのアッセイシステム

であって、

a) rs 2 7 3 6 1 0 0、rs 2 0 7 6 2 9 5、rs 3 7 7 8 3 3 7、rs 4 7 2 7 4 4 3、rs 8 6 8 9 0 3、rs 7 9 3 4 6 0 6、rs 6 4 2 1 9 7 2、rs 7 4 8 0 5 6 3、rs 7 9 4 2 8 5 0、rs 4 0 7 7 7 5 9、rs 2 3 3 4 6 5 9、rs 7 1 2 2 9 3 6、rs 2 0 3 4 6 5 0、rs 1 9 9 2 2 7 2、rs 1 9 8 1 9 9 7、rs 1 7 5 6 3 9 8 6、rs 8 0 7 0 7 2 3、rs 1 2 6 1 0 4 9 5、rs 2 1 0 9 0 6 9、rs 1 3 7 9 3 2 6、rs 1 8 8 1 9 8 4、rs 1 0 9 3 6 5 9 9、rs 1 9 9 7 3 9 2、rs 6 7 9 3 2 9 5、rs 2 6 0 9 2 5 5、rs 2 8 5 3 6 7 6、rs 1 0 4 8 4 3 2 6、rs 1 0 7 4 8 8 5 8、rs 2 0 6 7 8 3 2、rs 1 1 1 9 1 8 6 5、rs 2 3 0 1 1 6 0、rs 3 8 2 9 2 2 3、rs 2 8 5 7 4 7 6、rs 1 2 7 8 7 6 9、rs 1 0 0 7 1 7 7、rs 1 0 5 1 8 6 9 3、rs 3 9 3 1 5 2、rs 1 2 3 7 3 1 3 9、rs 1 7 6 9 0 7 0 3、rs 2 5 3 2 2 7 4、rs 2 5 3 2 2 6 9、rs 2 6 6 8 6 9 2、rs 1 6 9 2 0 1、rs 1 9 9 5 3 3、及びrs 4 1 5 4 3 0 から成る群から選択される遺伝的変異体の存在、

b) TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、またはそれらの相同体もしくは変異体から成る群から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子から成る群から選択されるマーカー遺伝子または複数のマーカー遺伝子の遺伝子発現のレベル、

c) b) のマーカー遺伝子によってコードされるポリペプチド、

d) c) のポリペプチドの断片、ならびに

e) b) のマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチド、のうちの少なくとも1つを検出するための手段を含む、アッセイシステムが、さらに提供される。いくつかの実施形態では、検出するための手段は、マーカー遺伝子多型もしくは遺伝子(複数可)の少なくとも10~50個の隣接する核酸、またはそれらの相補的核酸配列を含む核酸プローブを含む。いくつかの実施形態では、検出するための手段は、(a) の遺伝的変異体(複数可)に隣接するか、もしくはそれを含む配列にハイブリダイズする核酸プライマーまたはプローブを含む。いくつかの実施形態では、プライマーまたはプローブのうちの少なくとも1つは、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)アクセプターで標識され、プライマーまたはプローブのうちの少なくとも1つは、FRETドナーで標識される。いくつかの実施形態では、検出するための手段は、マーカー遺伝子でコードされたポリペプチドを特異的に検出する結合リガント(例えば、抗体、抗原結合抗体誘導体、または抗原結合抗体断片)を含む。いくつかの実施形態では、検出するための手段は、アッセイ表面(例えば、チップ、アレイ、ビーズ、微小流体表面、または流動性カード)上に配置される核酸プローブ及び/または結合リガントのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、プローブは、マーカー遺伝子の少なくとも10~50個の隣接する核酸に相補的な核酸配列を含む。

【0059】

間質性肺疾患を予測する、診断する、またはその予後診断をするためのキットが、さらに提供される。いくつかの実施形態では、キットは、TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、MUC5B、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、C17orf69、及びWNT3 から成る群から選択される遺伝子の遺伝的変異体を検出するための少なくとも1つの核酸プローブまたはプライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、選択される遺伝的変異体(複数可)を増幅するための試薬、例えば、選択される遺伝子の核酸を増幅するプライマー、ポリメラーゼ(例えば、Taq等の耐熱性ポリメラーゼまたは他のDNAもしくはRNAポリメラーゼ)、緩衝液等を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのプローブまたはプライマーは、遺伝的変異体の変異ヌクレオチド(例えば、劣性S

N P) に相補的である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのプローブまたはプライマーは、選択される遺伝的変異体ポリヌクレオチド配列またはその増幅産物に相補的である(ハイブリダイズする)。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのプローブまたはプライマーは、標識される。いくつかの実施形態では、標識は、蛍光標識、またはFRETアクセプターもしくはドナーである。いくつかの実施形態では、キットは、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)アクセプターで標識される少なくとも1つのプローブまたはプライマーと、FRETドナーで標識される少なくとも1つのプローブまたはプライマーと、を含む。いくつかの実施形態では、キットは、任意の組み合わせの上記遺伝子の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または22個において、各々が遺伝的変異体を検出するための少なくとも1つのプローブまたはプライマーを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの核酸プローブまたはプライマーは、アレイ、ビーズ、微小流体表面、またはチップ上に含まれる。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも1つの対照試料を含み、例えば、少なくとも1つの選択される遺伝的変異体の優性対立遺伝子を有する核酸を含む、または少なくとも1つの選択される遺伝的変異体の多型対立遺伝子を有する核酸を含む。

10

【0060】

間質性肺疾患を予測する、診断する、またはその予後診断をするためのキットであって、rs2736100、rs2076295、rs3778337、rs4727443、rs868903、rs7934606、rs6421972、rs7480563、rs7942850、rs4077759、rs2334659、rs7122936、rs2034650、rs1992272、rs1981997、rs17563986、rs8070723、rs12610495、rs2109069、rs1379326、rs1881984、rs10936599、rs1997392、rs6793295、rs2609255、rs2853676、rs10484326、rs10748858、rs2067832、rs11191865、rs2301160、rs3829223、rs2857476、rs1278769、rs1007177、rs10518693、rs393152、rs12373139、rs17690703、rs2532274、rs2532269、rs2668692、rs169201、rs199533、及びrs415430から成る群から選択される遺伝的変異体を検出するための少なくとも1つの核酸プローブまたはプライマーを含む、キットが、さらに提供される。いくつかの実施形態では、キットは、遺伝的変異体を含む核酸を増幅するための試薬(例えば、多型ヌクレオチドのいずれかの側のPCRプライマー、ポリメラーゼ、緩衝液等)を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのプローブまたはプライマーは、遺伝的変異体の変異ヌクレオチド(例えば、SNP)に相補的である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのプローブまたはプライマーは、選択される遺伝的変異体ポリヌクレオチド配列またはその増幅産物に相補的である(ハイブリダイズする)。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのプローブまたはプライマーは、標識される。いくつかの実施形態では、標識は、蛍光標識、またはFRETアクセプターもしくはドナーである。いくつかの実施形態では、キットは、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)アクセプターで標識される少なくとも1つのプローブまたはプライマーと、FRETドナーで標識される少なくとも1つのプローブまたはプライマーと、を含む。いくつかの実施形態では、キットは、任意の組み合わせの上記遺伝子の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、または45個において、各々が遺伝的変異体を検出するための少なくとも1つのプローブまたはプライマーを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの核酸プローブまたはプライマーは、アレイ、ビーズ、微小流体表面、またはチップ上に含まれる。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも1つの対照試料を含み、例えば、少なくとも1つの選択される遺伝的変異

20

30

40

50

体の優性対立遺伝子を有する核酸を含む、または少なくとも1つの選択される遺伝的変異体の多型対立遺伝子を有する核酸を含む。

【0061】

間質性肺疾患（例えば、線維性肺疾患、特発性肺線維症（IPF）、家族性間質性肺炎（FIP）、または特発性間質性肺炎（IIP））に関連付けられるバイオマーカー（例えば、遺伝的変異体）の検出において形成されるインビトロ複合体が、さらに提供される。間質性肺疾患は、線維性肺疾患であり得る。間質性肺疾患は、IPFであり得る。間質性肺疾患は、FIPであり得る。間質性肺疾患は、IIPであり得る。いくつかの実施形態では、複合体は、遺伝的変異核酸にハイブリダイズされる第1の核酸プローブを含み、遺伝的変異核酸は、遺伝的変異体TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、MUC5B、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、またはC17orf69遺伝子配列を含み、遺伝的変異核酸は、間質性肺疾患に罹患しているか、もしくは罹患している疑いのあるヒト対象から抽出されるか、または間質性肺疾患に罹患しているか、もしくは罹患している疑いのあるヒト対象から抽出される核酸の増幅産物である。いくつかの実施形態では、複合体は、遺伝的変異核酸にハイブリダイズされる第2の標識される核酸プローブをさらに含む。いくつかの実施形態では、第1の標識される核酸プローブは第1の標識を含み、第2の標識される核酸プローブは第2の標識を含み、第1及び第2の標識は、フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）が可能である。いくつかの実施形態では、複合体は、ポリメラーゼ（例えば、耐熱性ポリメラーゼ、または他のDNAもしくはRNAポリメラーゼ）またはリガーゼをさらに含む。いくつかの実施形態では、複合体は、遺伝的変異核酸にハイブリダイズされる核酸プライマーをさらに含む。

【0062】

以下の詳細な説明から、本開示の他の特徴及び利点が当業者に明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】加法モデル下で、1616症例及び4683対照を用いた439,828個のSNPのGWAS結果を示す。赤線より上のSNPは、 $P < 5 \times 10^{-8}$ で、ゲノムワイドで有意であった。これらのSNP及び $5 \times 10^{-8} < P\text{-値} < 0.0001$ に相当する赤線と青線との間のSNPを、876症例及び1890対照における経過観察に選択した。

【図2-1】発見及び複製結果のGWAS発見分析及びメタ分析においてゲノムワイド有意性に達する全ての遺伝子座に関する発見GWAS結果に対応する遺伝子座特異プロットを示す。

【図2-2】発見及び複製結果のGWAS発見分析及びメタ分析においてゲノムワイド有意性に達する全ての遺伝子座に関する発見GWAS結果に対応する遺伝子座特異プロットを示す。

【図2-3】発見及び複製結果のGWAS発見分析及びメタ分析においてゲノムワイド有意性に達する全ての遺伝子座に関する発見GWAS結果に対応する遺伝子座特異プロットを示す。

【図2-4】発見及び複製結果のGWAS発見分析及びメタ分析においてゲノムワイド有意性に達する全ての遺伝子座に関する発見GWAS結果に対応する遺伝子座特異プロットを示す。

【図2-5】発見及び複製結果のGWAS発見分析及びメタ分析においてゲノムワイド有意性に達する全ての遺伝子座に関する発見GWAS結果に対応する遺伝子座特異プロットを示す。

【図2-6】発見及び複製結果のGWAS発見分析及びメタ分析においてゲノムワイド有意性に達する全ての遺伝子座に関する発見GWAS結果に対応する遺伝子座特異プロットを示す。

【図2-7】発見及び複製結果のGWAS発見分析及びメタ分析においてゲノムワイド有

意性に達する全ての遺伝子座に関する発見 G W A S 結果に対応する遺伝子座特異プロットを示す。

【図 3 - 1】発見及び複製結果のメタ分析後、ゲノムワイド有意性に達する 4 個のさらなる遺伝子座に関する発見 G W A S 結果に対応する遺伝子座特異プロットを示す。

【図 3 - 2】発見及び複製結果のメタ分析後、ゲノムワイド有意性に達する 4 個のさらなる遺伝子座に関する発見 G W A S 結果に対応する遺伝子座特異プロットを示す。

【図 4】100 症例及び 94 対照からの肺組織中の D S P の相対的発現、A) 症例 / 対照の状態による相対的発現、B) D S P 中の $r s 2076295$ における遺伝子型による相対的発現を示す。

【図 5】439, 828 個の高品質 S N P にわたる G W A S に関して、観察された P 値対期待された P 値の分布の Q U A N T I L E - Q U A N T I L E (Q - Q) プロットを示す。

10

【図 6】ゲノムワイドで有意な遺伝子座の染色体位置、S N P、及び遺伝子を示す。

【図 7】ゲノムワイドで有意な $11p15$ の S N P 及び $r s 3570950$ の間の連鎖不平衡を示す。色付きは D' 推定値 = 1、白色は D' 推定値 = 0 を示す。正方形中の数は、 $r^2 * 100$ に相当する。表 2 及び表 6 の分析において使用された共同症例及び対照遺伝子型に基づく推定値。

【図 8】 $r s 3570950$ 遺伝子多型が予測的であることが発見された間質性肺疾患を有するファミリーにおけるゲノムワイド連鎖スキャンを概説する。

【図 9】間質性肺疾患に関連付けられる M U C 2、M U C 5 A C、及び M U C 5 B における S N P のオッズ比を示す。

20

【図 10】種々の研究群における M U C 5 B プロモーター S N P $R S 3570950$ の相関性の確認を示す。

【図 11】 $r s 3570950$ S N P を保有している間質性肺疾患患者に関連付けられる改善した生存期間を示す。

【図 12】異なる研究群における、 $r s 3570950$ S N P を保有している間質性肺疾患患者に関連付けられる改善した生存期間を示す。

【図 13】 $r s 3570950$ S N P を保有している間質性肺疾患患者に関連付けられる増加した生存期間に対する異なる研究群を比較する。

【図 14】M U C 5 B 遺伝子の構造及び $r s 3570950$ S N P の効果を示す。

30

【図 15】正常な肺組織対 I P F 肺組織中の M U C 5 B 発現を比較する。

【図 16】野生型 (G G) 対変異体 M U C 5 B (G T または T T) 遺伝子を保有する個体における正常な肺組織対 I P F 肺組織中の M U C 5 B 発現を示す。

【図 17】M U C 5 B 及び界面活性タンパク質 C (S P C) の発現が I P F 肺組織中で上方制御されることを示す。

【図 18】M U C 5 B $r s 3570950$ S N P に関連付けられる効果を概説する。

【図 19】肺線維症に関連付けられる遺伝子に関する遺伝子研究の効果を比較する。

【図 20】 $r s 3570950$ S N P を保有している患者における線維性肺組織を示す。

【図 21】少なくとも 1 つの変異体 $r s 3570950$ 対立遺伝子を保有している患者における間質性肺疾患の上昇した可能性を示す。

40

【図 22】肺線維症に関連付けられる遺伝子に関する遺伝子研究の効果を比較する。

【図 23】種々の間質性肺疾患の関連遺伝子マーカーに対するゲノムワイド研究 (G W A S) を概説する。

【図 24】本研究において考えられる個体の地理的起源を示す。

【図 25】G W A S 結果の概要を示す。

【図 26】間質性肺疾患に関連付けられる S N P の遺伝的位置を示す。

【図 27】遺伝子型集団及び複製集団における線維性状態の相対頻度を示す。

【図 28】複製集団における間質性肺疾患に関連付けられる S N P の遺伝的位置を示す。

【図 29】G W A S 研究の組み合わせた結果及び間質性肺疾患に関連付けられる S N P の位置を示す。

50

【図30】染色体17q21におけるSNPに対する血統の効果を示す。

【図31】染色体17q21上の種々のSNPに対する血統の効果に関するオッズ比(OR)及びP値を示す。

【図32】MUC5BプロモーターSNPの間質性肺疾患との関連に関するOR及びP値を示す。

【図33】SNP位置の観点から間質性肺疾患GWAS結果を要約する。

【図34】SNP位置の観点から間質性肺疾患GWAS結果を要約する。

【図35】遺伝子機能の観点から間質性肺疾患GWAS結果を要約する。

【発明を実施するための形態】

【0064】

別途規定されない限り、本明細書で使用される学術用語及び科学用語は、当該技術分野における通常の技能を有する者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、Lackie, Dictionary of Cell and Molecular Biology, Elsevier (4th ed. 2007); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)を参照されたい。「a」または「an」という用語は、「1つ以上」を意味することが意図される。「含む(comprise)」ならびに「含む(comprises)」及び「含むこと(comprising)」等のそれらの変形は、あるステップまたはある要素の記述が先行する場合、さらなるステップまたは要素の追加が任意であり、除外されないことを意味することが意図される。以下の定義は、本明細書で頻繁に使用されるある特定の用語の理解を促進するために提供され、本開示の範囲を制限することを意味しない。

【0065】

「対象」、「患者」、「個体」等の用語は、制限であるとは意図されず、概して、交換可能であり得る。つまり、「患者」として記載される個体は所与の疾患を必ずしも有していないが、単に医師の助言求めている場合がある。

【0066】

「対照」、「対照試料」、「標準対照」、または「対照値」は、試験試料との比較のための参照、通常、既知の参照として役立つ試料を指す。例えば、試験試料は、所与の肺疾患を有する疑いがある患者から採集することができ、既知の肺疾患患者、既知の遺伝子多型担体、または既知の正常(非疾患)個体からの試料と比較され得る。対照は、同様の個体、例えば、同様の病歴、同じ年齢、体重等を有する肺疾患患者または健康な個体の集団から集められた平均値を表すこともできる。対照値は、同じ個体から、例えば、疾患の前または治療の前よりも早く得られる試料から得ることもできる。当業者であれば、対照は、任意の数のパラメータの評定のために設計することができると理解するだろう。

【0067】

当業者であれば、どの対照が、所与の状況において有益であり、対照値との比較に基づいてデータを分析することができるかを理解するだろう。対照はまた、データの有意性の決定に有益でもある。例えば、所与のパラメータに対する値が対照中で幅広く可変である場合、試験試料中の変化は、有意であるとは考えられないだろう。

【0068】

「核酸」という用語は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド及び1本鎖もしくは2本鎖形態のいずれかのそれらのポリマー、ならびにそれらの相補体を指す。「核酸」もしくは「オリゴヌクレオチド」もしくは「ポリヌクレオチド」または本明細書で使用される文法的同等物は、互いに共有結合する少なくとも2個のヌクレオチドを意味する。オリゴヌクレオチドは、典型的には、約5、6、7、8、9、10、12、15、25、30、40、50以上のヌクレオチド長であり、最大約100ヌクレオチド長である。核酸及びポリヌクレオチドは、例えば、200、300、500、1000、2000、3000、5000、7000、10,000等のより長い長さを含む任意の長さのボ

10

20

30

40

50

リマーである。「ヌクレオチド」という用語は、典型的には、ポリヌクレオチドの単一ユニット、すなわち、モノマーを指す。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはそれらの修飾型であってもよい。

【0069】

本明細書で使用される場合、「遺伝的変異体」は、突然変異、単一ヌクレオチド遺伝子多型(SNP)、欠失変異体、ミスセンス変異体、挿入変異体、反転、またはコピー数変異体を指す。遺伝的変異体は、バイオマーカーとして使用することもでき、増加もしくは減少した発現レベルまたは特異的修飾をもたらし得る。

【0070】

「バイオマーカー」という用語は、生体試料(または生体試料に由来するか、または生体試料から処理される試料)中で検出され、特定の状態を示す対照試料と比較することができるバイOMETリックを指す。バイオマーカーの例としては、遺伝的変異体、増加もしくは減少した発現レベル(クロマチンオープニング、転写生成物、または翻訳生成物の検出によって決定される)、及び特異的修飾(例えば、核酸のメチル化、またはタンパク質のリン酸化、グリコシル化、もしくは多量体化)が挙げられる。「マーカー遺伝子」は、バイオマーカーに影響される遺伝子である。つまり、マーカー遺伝子は、より高いもしくはより低いレベルで発現される、または特定の状態、例えば、間質性肺疾患を示すように特異的に修飾された、そのゲノム形態における遺伝的変異を含み得る。

【0071】

「プローブ」または「プライマー」という用語は、試料への特異的ハイブリダイゼーションが検出され得る1つ以上の核酸断片を指す。プローブまたはプライマーは、使用されるだろう特定の技法に応じて任意の長さのものであり得る。例えば、PCRプライマーは、一般的に、10~40ヌクレオチド長であるが、例えば、サザンブロット用の核酸プローブは、100ヌクレオチド長より長くてもよい。プローブまたはプライマーは、標的配列へのその結合が検出され得るように(例えば、FRETドナーまたはアクセプター標識を用いて)、以下に記載されるように標識されなくてもよく、または標識されてもよい。プローブまたはプライマーは、染色体、例えば、1つ以上のクローン、単離された全染色体もしくは染色体断片、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅産物の採取の1つ以上の特定の(事前に選択される)位置に基づいて設計され得る。標的要素上に固定される核酸の長さ及び複雑性は、本発明に重要ではない。当業者であれば、これらの要素を調整して、所与のハイブリダイゼーション及び検出手順のための最適なハイブリダイゼーション及びシグナル産生を提供し、異なる遺伝子またはゲノム位置間の必要な分解能を提供することができる。

【0072】

プローブ及びプライマーは、一列に整列して、固体表面(例えば、ニトロセルロース、ガラス、石英、溶融シリカスライド)上に固定化することができる。また、高密度アレイを生成するための技法も本目的に使用することができる(例えば、Fodor(1991) Science 767-773、Johnston(1998) Curr. Biol. 8: R171-R174、Schummer(1997) Biotechniques 23: 1087-1092、Kern(1997) Biotechniques 23: 120-124、米国特許第5,143,854号を参照されたい)。当業者であれば、特定のプローブ及びプライマーの正確な配列が、標的配列に「実質的に同一」または「実質的に相補的」であるが、それらが由来する同じ標的に特異的に結合する(すなわち、特異的にハイブリダイズする)能力を保持するプローブを生成するために標的配列からある程度修飾され得ることを理解するだろう。

【0073】

プローブまたはプライマーは、遺伝的変異体を覆う、またはそこに隣接する領域に相補的である場合、遺伝的変異体を「検出することができる」。例えば、SNPを検出するために、プライマーは、SNPのいずれかの側の上に設計され得、SNPの位置でのヌクレオチドの同一性を決定するために使用されるプライマー伸長。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

FRETシグナルが両方のプライマーのハイブリダイゼーションのときにだけ検出されるように、FRETで標識されたプライマーが使用される（少なくとも1つのFRETドナーで標識されたもの及び少なくとも1つのFRETアクセプターで標識されたもの）。いくつかの実施形態では、プローブは、それが遺伝的変異体にのみ、または優性配列にのみハイブリダイズするような条件において使用される。

【0074】

この場合もやはり、核酸との関連において、「ハイブリダイズすることができる」という用語は、相補的配列とワトソン・クリック結合を形成するポリヌクレオチド配列を指す。当業者であれば、相補性パーセントは、ポリヌクレオチドの長さ、相補的領域の長さ（例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれ以上の塩基長）、及び条件のストリンジェンシーに応じてハイブリダイゼーションが生じるために100%である必要はないことを理解するだろう。例えば、ポリヌクレオチド（例えば、プライマーまたはプローブ）は、相補的領域の広がりによって60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の相補性を有するポリヌクレオチドへの結合が可能であってもよい。遺伝的変異体の検出との関連において、許容できる相補性パーセントまたはミスマッチの数は、検出のために使用される技法によって異なるだろう（以下を参照されたい）。

【0075】

核酸との関連において、「増幅産物」という用語は、増幅反応に起因する核酸（例えば、ポリヌクレオチド）、例えば、PCR及びその変形、rtPCR、鎖置換反応（SDR）、リガーゼ鎖反応（LCR）、転写媒介増幅（TMA）、またはQ複製を指す。耐熱性ポリメラーゼ、例えば、Taqは、周期的温度または極端な温度を伴う増幅手順（例えば、PCR及びその変形）の全体を通して、ポリメラーゼの累加を避けるために使用され得る。

【0076】

「標識」、「検出可能部分」、「検出可能薬剤」という用語、及び同様の用語は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、または他の物理的手段によって検出可能な組成物を指す。例えば、有用な標識には、蛍光染料、発光剤、放射性同位体（例えば、 ^{32}P 、 ^3H ）、高電子密度試薬、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニン、もしくはハプテン及びタンパク質、または、例えば、親和性によって検出可能にすることができる他の実体が挙げられる。核酸または他の生体分子を標識に共役するための任意の当該技術分野で既知の方法が用いられてもよく、例えば、Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diegoに記載される方法が使用される。「タグ」という用語は、「標識」という用語の同意語として使用され得るが、一般的には、親和性に基づく部分、例えば、精製のための「Hisタグ」、またはビオチンと相互作用する「ストレプトアビジンタグ」を指す。

【0077】

「標識」分子（例えば、核酸、タンパク質、または抗体）とは、その分子に結合される標識の存在を検出することによって、その分子の存在が検出され得るように、リンカーもしくは化学的結合を通して共有結合的に、またはイオン結合、ファンデルワールス結合、静電結合、もしくは水素結合を通して非共有結合的に標識に結合されるものである。

【0078】

蛍光共鳴エネルギー移動としても既知であるフェルスター共鳴エネルギー移動（FRETと略される）は、2つの発色団の間のエネルギー移動を表す機構である。最初はその電子的励起状態にあるドナー発色団（FRETドナー）は、エネルギーを、非放射性双極子-双極子カップリングを通して、典型的には10nm未満離して、アクセプター発色団（FRETアクセプター）に移動することができる。FRETアクセプターに移動されたエネルギーは、FRETドナー及びアクセプターが接近しているとき、光（エネルギー）の

放出として検出される。「FRETシグナル」は、このようにして、アクセプターからの光の放出によって生成されるシグナルである。Rの距離で離されるドナーとアクセプター染料との間のフェルスター共鳴エネルギー移動の効率は、 $E = 1 / [1 + (R / R_0)^6]$ によって得られ、 R_0 は、 $E = 1 / 2$ におけるドナー - アクセプター対のフェルスター半径である。 R_0 は、いくつかの一般的に使用される染料対（例えば、Cy3 - Cy5）に対して約50 - 60 Åである。FRETシグナルは、6乗までの距離に比例して変化する。ドナー - アクセプター対が、 R_0 の周りに位置する場合、1 Å ~ 50 Åの範囲の距離の小さな変化は、ノイズへのより大きなシグナルを用いて測定することができる。現在の技術を用いて、多くの単一のFRET対の1 msまたはそれより速い並列撮像が、実現可能である。

10

【0079】

「FRET対」は、FRET検出が可能であるFRETドナー及びFRETアクセプター対を指す。

【0080】

「蛍光色素分子」、「染料」、「蛍光分子」、「蛍光染料」、「FRET染料」という用語、及び同様の用語は、別途指示のない限り、本明細書において同義的に使用され得る。

【0081】

本明細書で使用される場合、「治療する」及び「予防する」という用語は、絶対的な用語であるとは意図されない。治療は、発症の任意の遅延、症状の頻度または重症度の低下、症状の回復、患者の快適さ及び/または呼吸機能の改善等を指すことができる。治療の効果は、所与の治療を受けていない個体もしくは個体のプールと、または治療中止前もしくは治療中止後の同じ患者と比較することができる。

20

【0082】

「予防する」という用語は、患者における肺疾患症状の発生の減少を指す。上で示されるように、予防は、完全（検出可能な症状がない）、または、治療がない場合に生じたらうよりも少ない症状が観察されるような、部分的であり得る。

【0083】

「治療有効量」という用語は、本明細書で使用される場合、上に記載されるような障害を回復させるのに十分な治療薬の量を指す。例えば、所与のパラメータに関して、治療有効量は、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、もしくは少なくとも100%の増加または減少を示すだろう。治療の効能は、「～倍」の増加または減少として表現することもできる。例えば、治療有効量は、対照に対して、少なくとも1.2倍、1.5倍、2倍、5倍、またはそれ以上の効果を有し得る。

30

【0084】

「診断」という用語は、対象において肺疾患が存在する相対的な見込みを指す。同様に、「予後」という用語は、ある特定の将来の結果が対象において生じ得る相対的な見込みを指す。例えば、本発明との関連において、予後診断は、個体が、肺疾患を発症するだろう可能性、または疾患の予想される重症度（例えば、症状の重症度、機能低下の速度、生存等）を指すことができる。本用語は、医療診断の分野における任意の当業者によって理解されるように、絶対的であるとは意図されない。

40

【0085】

肺疾患危険因子の決定を参照する「関連させること」及び「関連付けられる」という用語は、個体における危険因子（例えば、ムチン遺伝子の調節不全または遺伝的変異）の存在または量を、肺疾患に冒されていることが既知である人物、または肺疾患の危険性があることが既知である人物、または肺疾患に罹患していないことが既知である人物におけるその存在または量と比較すること、及び肺疾患に罹患している/それを発症する増加または減少した見込みを、アッセイ結果（複数可）に基づいて個体に割り当てることを指す。

【0086】

50

本発明者らは、IIPの危険性への重要な一因である遺伝子多型及び遺伝子発現プロファイルを発見した。これらの発見には、8個の新しい遺伝的に危険な遺伝子座(4q22、6p24、7q22、10q24、13q34、15q14-15、17q21、及び19p13)、ならびに3個の以前に報告された遺伝子/遺伝子座(TERC[3q26]、TERT[5p15]、及びMUC5B[11p15])における危険な変異体のIIPにおける役割を含む。本発見の前は、再現性よくIIPに関連する一般的な変異体を有するたった2個の遺伝子は、TERT及びMUC5Bであった。まとめると、IIPに関連付けられる一般的に危険な変異体は、この疾患が、宿主防御、細胞間接着、及び早期細胞老化における欠損によって主に媒介されることを示唆する。これらの発見は、この複雑な疾患における介入試験及び治療を導くために使用することができる。

10

【0087】

1つの定義によると、生体マーカーは、「治療的介入に対する正常な生物学的プロセス、病原的プロセス、または薬理学的応答の指標として客観的に測定及び評価される特質である」。NIH Biomarker Definitions Working Group (1998)。生体マーカーはまた、特定の生物学的プロセス(「マーカーのパネル」)を示す特性のパターンまたは集合も含み得る。マーカー測定値は、特定の生物学的現象またはプロセスを示すように、増加または減少され得る。加えて、マーカー測定値が、特定の生物学的プロセスの不在下で典型的に変化する場合、一定の測定値は、そのプロセスの発生を示し得る。

【0088】

20

マーカー測定値は、絶対値(例えば、生体試料中の分子のモル濃度または遺伝子多型の存在もしくは不在)または相対値(例えば、生体試料中の2つの分子の相対濃度)のものであり得る。2つ以上の測定値の商または積も、マーカーとして使用され得る。例えば、冠動脈疾患を発症する危険性のマーカーとして、総血液コレステロールを使用する医師もいれば、総コレステロール対HDLコレステロールの比率を使用する医師もいる。

【0089】

本開示では、マーカーは、主に、診断及び予後診断の目的のために使用される。しかしながら、それらはまた、治療目的、薬物スクリーニング目的、及び個体の層化目的のため(例えば、個体をいくつかの評価のための「部分集合」にグループ化するため)、ならびに間質性肺疾患治療の有効性の評価を含む、本明細書に記載される他の目的のために使用されてもよい。

30

【0090】

本開示の実践は、別途指示のない限り、当該技術分野で一般的に既知である分析生化学、微生物学、分子生物学、及び組み換えDNA技法の従来的方法を用いる。このような技法は文献中で十分に説明される。(例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 2000、DNA Cloning: A Practical Approach, Vol. I&II (Glover, ed.), Oligonucleotide Synthesis (Gait, ed., Current Edition)、Nucleic Acid Hybridization (Hames & Higgins, eds., Current Edition)、Transcription and Translation (Hames & Higgins, eds., Current Edition)、CRC Handbook of Parvoviruses, Vol. I&II (Tijessen, ed.), Fundamental Virology, 2nd Edition, Vol. I&II (Fields and Knipe, eds.)を参照されたい)。

40

【0091】

本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態の説明のためのものであり、限定す

50

るようには意図されない。本明細書で使用される場合、単数形「a」、「and」、及び「the」は、別途内容及び文脈が明らかに記載しない限り、複数の指示対象を含む。このため、例えば、「マーカー」への言及は、2つ以上のそのようなマーカーの組み合わせを含む。別途規定されない限り、全ての科学用語及び学術用語は、それらが関連する当該技術分野で一般的に使用されるものと同じ意味を有すると理解される。本開示の目的において、次の用語は、以下に定義される。

【0092】

本明細書で使用される場合、「マーカー」という用語は、ポリペプチドマーカー及びポリヌクレオチドマーカーを含む。本開示を明確にするために、本開示の態様は、「ポリペプチドマーカー」及び「ポリヌクレオチドマーカー」に関連して記載されるだろう。しかしながら、「ポリペプチドマーカー」に関連する本明細書の記述は、本開示の他のポリペプチドに適用されることが意図される。同様に、「ポリヌクレオチド」マーカーに関連する本明細書の記述は、それぞれ、本開示の他のポリヌクレオチドに適用されることが意図される。このため、例えば、「ポリペプチドマーカー」をコードするとして記載されるポリヌクレオチドは、ポリペプチドマーカー、ポリペプチドマーカーに実質的な配列同一性を有するポリペプチド、修飾ポリペプチドマーカー、ポリペプチドマーカーの断片、ポリペプチドマーカーの前駆体及びポリペプチドマーカーの後続体(successor)、ならびにポリペプチドマーカー、相同ポリペプチド、修飾ポリペプチドマーカーを含む分子、またはポリペプチドマーカーの断片、前駆体、もしくは後続体(successor)(例えば、融合タンパク質)をコードするポリヌクレオチドを含むことが意図される。

【0093】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、少なくとも5個の隣接するアミノ酸残基、例えば、5、6、7、8、9、10、11、または12個以上のアミノ酸長(ポリペプチドの完全長までの各整数を含む)を有するアミノ酸残基のポリマーを指す。ポリペプチドは、2個以上のポリペプチド鎖で構成され得る。ポリペプチドは、タンパク質、ペプチド、オリゴペプチド、及びアミノ酸を含む。ポリペプチドは、直鎖または分岐鎖であってもよい。ポリペプチドは、修飾アミノ酸残基、アミノ酸類似体、または天然に生じないアミノ酸残基を含んでもよく、非アミノ酸残基によって遮られ得る。天然に、または介入、例えば、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、脂質化、メチル化、アセチル化、リン酸化によるもの、もしくは標識成分との複合体化等の操作によるものかに関わらず、修飾されたアミノ酸ポリマーは、本定義内に含まれる。過剰発現されたポリペプチドマーカーに応答する対象によって生成された抗体も含まれる。

【0094】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドの「断片」は、完全長ポリペプチドよりも短い複数のアミノ酸残基を指す。例えば、所与のポリペプチドの断片は、完全長のポリペプチドの少なくとも5個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも10個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも20個の隣接するアミノ酸残基、または少なくとも30個の隣接するアミノ酸残基を含み得る。本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチド「断片」は、少なくとも5、10、もしくは15個の隣接する核酸残基、少なくとも30個の隣接する核酸残基、少なくとも60個の隣接する核酸残基、またはポリヌクレオチドの配列の少なくとも90%を有する核酸配列を含む核酸残基のポリマーを指す。いくつかの実施形態では、断片は、完全長ポリペプチドのドメイン(例えば、機能ドメイン)を表す。いくつかの実施形態では、断片は、所与のドメインを引いた完全長ポリペプチドを表す。いくつかの実施形態では、断片は、抗原性断片であり、断片の大きさは、抗体によって認識されたエピートープが、直鎖エピートープであるか、または構造的エピートープであるかどうか等の要因に左右されるだろう。このため、より長いセグメントから成る抗原性断片もあれば、より短いセグメントから成るものもあるだろう(例えば、5、6、7、8、9、10、11、または12以上のアミノ酸長であり、ポリペプチドの完全長までの各整数を含む)。当業者であれば、抗原結合抗体、抗体誘導體、及び抗体断片によって結合される抗原性断片を選択するための方法を熟知している。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドマーカ―は、生物学的経路の要素である。本明細書で使用される場合、「前駆体」または「後続体 (s u c c e s s o r) 」という用語は、生物学的経路においてポリペプチドマーカ―またはポリヌクレオチドマーカ―が先行するか、または後に続く分子を指す。このため、ポリペプチドマーカ―またはポリヌクレオチドマーカ―が、1つ以上の生物学的経路の要素としていったん特定されると、本開示は、生物学的経路のさらなる前駆体または後続体 (s u c c e s s o r) 要素を含むことができる。生物学的経路及びそれらの要素のそのような特定は、当業者が備えている技能の範囲内である。

【 0 0 9 6 】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、任意の長さの核酸残基の単一のヌクレオチドまたはポリマーを指す。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、及び/またはそれらの類似体を含むしてもよく、二本鎖または一本鎖であってもよい。ポリヌクレオチドは、修飾核酸 (例えば、メチル化)、核酸類似体、または天然に生じない核酸を含んでもよく、非核酸残基によって遮られ得る。例えば、ポリヌクレオチドは、任意の配列の遺伝子、遺伝子断片、cDNA、単離DNA、mRNA、tRNA、rRNA、単離RNA、組み換えポリヌクレオチド、プライマー、プローブ、プラスミド、及びベクターを含む。天然に、または介入によるものに関わらず修飾された核酸ポリマーは、本定義内に含まれる。

【 0 0 9 7 】

本明細書で使用される場合、成分 (例えば、マーカ―) は、成分を検出するために使用される方法が、2つの試料に適用される際、異なるレベルまたは活性を提供する場合、1つの試料中で、別の試料と比較して「差次的に発現される」と称される。成分は、成分を検出するための方法が、成分のレベルまたは活性が、第1の試料中で第2の試料中よりも高いことを示す場合 (または成分が第1の試料中で検出可能であるが、第2の試料中でそうではない場合)、第1の試料中で「増加した」と称される。逆に、成分を検出するための方法が、成分のレベルまたは活性が、第1の試料中で第2の試料中よりも低いことを示す場合 (または成分が第2の試料中で検出可能であるが、第1の試料中でそうではない場合)、第1の試料中で「減少した」と称される。具体的には、マーカ―は、マーカ―のレベルまたは活性が、非間質性肺疾患対象から得られる試料 (または試料の集合)、または参照値もしくは参照範囲中のマーカ―のレベルと比較してそれぞれ、高いまたは低い場合、間質性肺疾患対象 (または間質性肺疾患に罹患している疑いがある、もしくは間質性肺疾患を発症する危険性がある対象) から得られる試料 (または試料の集合) 中で「増加した」または「減少した」と称される。

【 0 0 9 8 】

間質性肺疾患において発現すると特定されたマーカ―は、重要な生物学的対象である。IIPの症例 - 対照ゲノムワイド研究 (GWAS、1616症例及び4683対照) ならびに複製研究 (876症例及び1890対照) を行った。a) IIP診断における識別は、実質的な臨床的、病理学的、及び放射線学的重複に起因してしばしば問題があり、b) 共通遺伝的感受性に対する有力な証拠が存在するため、線維性IIPの全ての型を本症例群に含んだ。MUC5B、TERT、TERC、及びSFTPC変異体が、散発性IIPがこの疾患の家族性形態に遺伝的に類似しているという証拠を提供するため、家族性及び散発性IIPの両方もまた本症例群に含んだ。本結果は、IIPが独立して、または組み合わせる複数の遺伝的変異体によって生じること、ならびに同じ遺伝的変異体が、異なる組織型のIIPを引き起こし得ることを示す。

【 0 0 9 9 】

以下に詳細に説明されるように、遺伝子多型及び遺伝子発現プロファイルを、IIPに関連付けられる臨床的パラメータ及び一般的に危険な変異体と比較したとき、結果は、この疾患が、宿主防御、細胞間接着、及び早期細胞老化における欠損によって主に媒介されることを示す。これらの発見は、この複雑な疾患における介入試験を導くために使用する

ことができる。

【0100】

間質性肺疾患の診断、予後診断、または他の評価もしくは研究のためのアッセイ及びキットにおいて個々に、または任意の組み合わせで使用することができるバイオマーカーの発見に加えて、間質性肺疾患の疾患プロセスにおいて役割を果たすことが以前は認識されていなかったバイオマーカーは、現在、より詳細に研究することができ、及び/または疾患の他のモジュレーターもしくは治療薬の発見のための標的として使用することができる。本開示のマーカーは、遺伝子多型：rs1379326、rs1881984、rs10936599、rs1997392、rs6793295、rs2609255、rs2853676、rs10484326、rs10748858、rs2067832、rs11191865、rs2301160、rs3829223、rs2857476、rs1278769、rs1007177、rs10518693、rs393152、rs12373139、rs17690703、rs2532274、rs2532269、rs2668692、rs169201、rs199533、及びrs415430を含む。本開示のマーカーはまた、遺伝子：TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、及びC17orf69における増加した遺伝子発現も含む。

10

【0101】

遺伝子の名称を考慮すると、タンパク質（本明細書において「完全タンパク質」とも称される；「タンパク質」を示す）、及びそのような測定されるタンパク質の他のペプチド断片を得ることができ（どんな手段であっても）、そのような他のペプチド断片は、本開示の範囲内に含まれる。本開示の方法は、列挙される遺伝子の発現の生成物の断片、ならびに完全な列挙される分子、または少なくともそれらのかなりの部分（例えば、測定される独特のエピトープ）を含有する分子、及びマーカーの修飾型を評価するために使用され得る。したがって、そのような断片、より大きい分子、及び修飾型は、本開示の範囲内に含まれる。

20

【0102】

本開示のマーカーの相同体及び対立遺伝子は、従来の技法によって特定され得る。本明細書で使用される場合、例えば、ヒトまたは他の動物からの遺伝子またはポリペプチドの相同体は、特定される遺伝子またはポリペプチドの高度の構造的及び機能的類似性を有する。本明細書で特定されるポリペプチドマーカーのヒト及び他の有機体相同体の特定は、当業者であれば、よく理解しているだろう。一般的に、核酸ハイブリダイゼーションは、既知の配列に対応する別の種（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ）の相同配列の特定に対して好適な方法である。標準的な核酸ハイブリダイゼーション手順を使用して、選択される同一性パーセントの関連核酸配列を特定することができる。例えば、選択される組織（例えば、結腸）のmRNAから逆転写されるcDNAsのライブラリーを構築し、関連ヌクレオチド配列に対してそのライブラリーをスクリーンするために、本明細書で特定されるポリペプチドをコードする核酸を使用することができる。スクリーニングは、好ましくは、配列同一性によって密接な関係するそれらの配列を特定する高ストリンジェンシーな条件（本明細書の他の場所に記載される）を使用して実施される。そのように特定される核酸は、ポリペプチド中に翻訳され、そのポリペプチドは、活性を試験され得る。

30

40

【0103】

さらに、本開示は、本開示のマーカーに実質的に類似の配列同一性を有するポリヌクレオチド及びポリペプチドを含む。本明細書で使用される場合、2個のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それらのアミノ酸配列間に少なくとも約70%の配列同一性、少なくとも約80%の配列同一性、少なくとも約90%の配列同一性、少なくとも約95%の配列同一性、少なくとも約99%の配列同一性、もしくは100%の配列同一性がある場合、またはポリヌクレオチド（例えば、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）が

50

、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で互いに安定した二重鎖を形成することができる場合、「実質的な配列同一性」を有する。本開示との関連において、遺伝的変異体は、マーカー遺伝子が1つを超える遺伝的変異の部位を有する場合であっても、マーカー遺伝子中で検出され得る。つまり、選択される遺伝的変異体は、例えば、遺伝的変異体を含むマーカー遺伝子の配列を決定することによって、間質性肺疾患を有する疑いがある個体からの試験試料中で検出され、対照または対照集団からのマーカー遺伝子の配列と比較され得る。試験及び対照完全長マーカー遺伝子配列は、1つを超える遺伝的変異体を含む場合があり、このため、互いに異なり得る、すなわち、100%同一でなくてもよい。当業者であれば、遺伝的変異体が、例えば、遺伝的変異体部位を含むマーカー遺伝子の断片を増幅するPCRまたは遺伝的変異体部位を含む配列に相補的なプローブを使用して、完全長未満のマーカー遺伝子配列である配列中で検出され得ることを理解するだろう。態様または実施形態が、配列同一性に言及する場合、その配列同一性は、本明細書に開示されるように、配列の一部に関わり得る（例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれ以上の核酸塩基またはアミノ酸長）。

10

【0104】

前述のポリペプチドの機能的に同等な変異体を提供するために保存的アミノ酸置換がポリペプチド中で行われてもよく、すなわち、変異体は、ポリペプチドの機能的能力を保持する。本明細書で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸置換が行われるタンパク質の相対電荷またはサイズ特性を変更しないアミノ酸置換を指す。変異体は、当業者に既知の、ポリペプチド配列を変えるための方法に従って調製することができる。例えば、ペプチドが間質性肺疾患関連ポリペプチドであることを決定する際に、そのペプチドのアミノ酸配列に保存的アミノ酸置換を行い、依然として、その特定の抗体結合特性を保持するポリペプチドを有することができる。さらに、当業者であれば、対立遺伝子変異体及びSNPが、実質的に類似するポリペプチド及び同じもしくは実質的に類似するポリペプチド断片を生じさせるだろうことを理解するだろう。

20

【0105】

いくつかの比較研究を実施し、間質性肺疾患及び非間質性肺疾患（例えば、「対照」）個体の種々の群を使用してマーカーを特定した。表は、統計的有意性を伴って存在するか、または差次的に発現されることが発見されたマーカーを列挙する。したがって、これらのバイオマーカーは、間質性肺疾患及び疾患進行の指標である。ポリペプチドマーカーが複数の研究において統計的に有意であることが分かった場合、最も高い統計的有意性の観察に関連付けられるデータが提示される。したがって、1つの態様では、本開示は、間質性肺疾患のポリペプチドバイオマーカーを提供する。別の実施形態では、本開示は、ポリペプチドマーカーとの実質的な配列同一性を有するポリペプチドを提供する。別の実施形態では、本開示は、前述のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを含む分子を提供する。本明細書で使用される場合、化合物は、それが天然に会合している、少なくとも1つの成分から分離されたとき、「単離される」と称される。例えば、ポリペプチドは、代謝産物、ポリヌクレオチド、及び他のポリペプチドを含む混入物質から分離される場合、単離されたと考えられ得る。単離される分子は、合成的に調製されるか、またはそれらの自然環境から精製され得る。当該技術分野で既知の標準的な定量方法論を用いて、本開示の分子を得て、単離することができる。

30

40

【0106】

いくつかの変異は、マーカーの物理的及び化学的特性の測定値において固有である。変異の規模は、測定値を得るために使用される分離手段の再現性ならびに検出手段の特異性及び感受性にある程度左右される。好ましくは、マーカーを測定するために使用される方法及び技法は、感受性及び再現可能である。

【0107】

表に示されるデータは、マーカーを検出するために使用された方法を反映する。試料が実施例に記載されるように処理及び分析される場合、マーカーの保持時間は、およそ、マ

50

ーカーに関して表示される値であり、つまり、表示される値の約 10 % 以内、表示される値の約 5 % 以内、または表示される値の約 1 % 以内であり、マーカーは、およそ、マーカーに関して表示される値の質量対電荷比を有する、つまり、表示される値の約 10 % 以内、表示される値の約 5 % 以内、または表示される値の約 1 % 以内である。

【0108】

本開示の別の実施形態は、間質性肺疾患に罹患する個体中で差次的に発現されるバイオマーカーの発現の検出のための複数の抗体もしくはそれらの抗原結合断片またはアプタマーを含むアッセイシステムに関する。複数の抗体もしくはそれらの抗原結合断片またはアプタマーは、間質性肺疾患に罹患する個体中で差次的に発現されるタンパク質に選択的に結合する抗体もしくはその抗原結合断片またはアプタマーから成り、それらは、抗体またはアプタマーを使用してタンパク質生成物として検出され得る。加えて、複数の抗体もしくはそれらの抗原結合断片またはアプタマーは、本明細書に提供される表からの遺伝子のうちのいずれかによってコードされるタンパク質またはその部分（ペプチド）に選択的に結合する抗体もしくはその抗原結合断片またはアプタマーを含む。

10

【0109】

本開示のある特定の実施形態は、間質性肺疾患に罹患する対象中に存在するか、または差次的に発現されると本明細書で特定された複数のバイオマーカーを利用する。本明細書で使用される場合、「患者」、「間質性肺疾患に罹患している対象」、「間質性肺炎に罹患している対象」、「間質性肺疾患患者」、「間質性肺炎対象」等の用語は、間質性肺疾患（例えば、IIP、IPF、FIP）と診断された対象を指すことが意図される。「非対象」、「正常な個体」、「間質性肺疾患に罹患していない対象」等の用語は、間質性肺疾患と診断されていない対象を指すことが意図される。非間質性肺疾患対象は、健常であり、他の疾患を有しなくてもよく、またはそれらは間質性肺疾患以外の疾患を有してもよい。

20

【0110】

上記限定内の複数のバイオマーカーは、少なくとも2個以上のバイオマーカー（例えば、全整数単位で少なくとも2、3、4、5、6等から開示されるバイオマーカーの全てまで）を含み、そのようなバイオマーカーの任意の組み合わせを含む。そのようなバイオマーカーは、本明細書に提供される表に列挙される遺伝子多型またはポリペプチド、及び表に列挙される遺伝子のうちのいずれかによってコードされるポリペプチドのうちのいずれかから選択される。いくつかの実施形態では、本開示において使用される複数のバイオマーカーは、間質性肺炎等の間質性肺疾患に罹患していると診断されるか、またはその疑いがある個体の、発症または進行または臨床転帰の予測となることが実証されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40個、またはその全てを含む。

30

【0111】

本開示のポリペプチド及びポリヌクレオチドマーカーは、間質性肺疾患を診断する、疾患の度合い及び/または重症度を決定する、疾患の進行、療法への応答、及び/または肺移植の必要性を監視するための方法において有用である。マーカーはまた、間質性肺疾患を治療するための方法ならびに疾患のための治療の効能を評価するための方法においても有用である。そのような方法は、ヒト及び非ヒト対象において実施され得る。マーカーはまた、薬学的組成物として、またはキットにおいて使用され得る。マーカーはまた、それらの発現を調節する候補化合物をスクリーニングするために使用され得る。マーカーはまた、間質性肺疾患の治療のための候補薬物をスクリーニングするために使用され得る。そのようなスクリーニング法は、ヒト及び非ヒト対象において実施され得る。

40

【0112】

ポリペプチドマーカーは、当該技術分野で既知の任意の好適な方法によって単離され得る。ネイティブポリペプチドマーカーは、当該技術分野で既知の標準的方法（例えば、ク

50

ロマトグラフィー、遠心分離、較差溶解度、免疫アッセイ)によって天然源から精製することができる。1つの実施形態では、ポリペプチドマーカ―は、本明細書に開示されるクロマトグラフ法を使用して血清試料から単離され得る。別の実施形態では、ポリペプチドマーカ―は、試料をマーカ―に特異的に結合する基質結合抗体またはアプタマーと接触させることによって、試料から単離され得る。

【0113】

ポリヌクレオチドマーカ―は、ゲノムDNA、cDNA、またはmRNA転写物中で発見されることがあり、本開示のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み得る。1つの実施形態では、本開示は、ポリペプチドマーカ―またはそのようなポリペプチドを含む分子をコードするポリヌクレオチドを提供する。別の実施形態では、本開示は、ポリ

10

【0114】

別の実施形態では、本開示は、マーカ―の断片、前駆体、後続体(successor)、もしくは修飾型であるポリペプチド、またはそのようなポリペプチドを含む分子をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0115】

別の実施形態では、本開示は、マーカ―の断片、前駆体、後続体(successor)、もしくは修飾型であるポリペプチド、またはそのようなポリペプチドを含む分子をコードするポリヌクレオチドへの実質的な配列類似性を有するポリヌクレオチドを提供する。2個のポリヌクレオチドは、それらのアミノ酸配列間に少なくとも約70%の配列同一性、少なくとも約80%の配列同一性、少なくとも約90%の配列同一性、少なくとも約95%の配列同一性、もしくは少なくとも99%の配列同一性がある場合、またはポリヌクレオチドが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で互いに安定した二重鎖を形成することができる場合、「実質的な配列同一性」を有する。そのような条件は、本明細書の他の場所に記載される。ポリペプチドに関連して上に記載されるように、本開示は、SNPの結果である対立遺伝子変異体であるポリヌクレオチド、または別の場合には、遺伝コードの縮重に固有であるネイティブ物質中のそれらの存在に対するコドンであるポリヌクレオチドを含む。

20

【0116】

いくつかの実施形態では、記載されるポリヌクレオチドは、間質性肺疾患の代用マーカ―として使用され得る。このため、例えば、ポリペプチドマーカ―のレベルが間質性肺疾患対象中において上昇する場合、ポリペプチドマーカ―よりもむしろ、そのポリペプチドマーカ―をコードするmRNAにおける上昇が詮索され得る(例えば、対象における間質性肺疾患を診断するため)。

30

【0117】

ポリヌクレオチドマーカ―は、当該技術分野で既知の任意の好適な方法によって単離され得る。ネイティブポリヌクレオチドマーカ―は、当該技術分野で既知の標準的な方法によって天然源から精製され得る。1つの実施形態では、ポリヌクレオチドマーカ―は、混合物を、ハイブリダイゼーション条件下でポリヌクレオチドマーカ―に相補的な基質結合プローブと接触させることによって、混合物から単離され得る。

40

【0118】

あるいは、ポリヌクレオチドマーカ―は、当該技術分野で既知の任意の好適な化学的または組み換え法によって合成され得る。1つの実施形態では、例えば、マーカ―は、有機化学の方法及び技法を使用して合成され得る。別の実施形態では、ポリヌクレオチドマーカ―は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって生成され得る。

【0119】

本開示は、本開示のポリペプチドまたはポリヌクレオチドマーカ―に特異的に結合する分子も包含する。1つの態様では、本開示は、ポリペプチドマーカ―またはポリヌクレオチドマーカ―に特異的に結合する分子を提供する。本明細書で使用される場合、「特異的

50

に結合すること」という用語は、結合対（例えば、抗体及び抗原またはアプタマー及びその標的）の間の相互作用を指す。いくつかの実施形態では、相互作用は、最大 10^{-6} モル/リットル、最大 10^{-7} モル/リットル、または最大 10^{-8} モル/リットルの親和性定数を有する。他の実施形態では、「特異的に結合すること」という語句は、一方のタンパク質から他方（例えば、抗体、その断片、または抗原に対する結合パートナー）への特異的結合を指し、任意の標準的アッセイ（例えば、免疫アッセイ）によって測定される結合のレベルは、そのアッセイのバックグラウンド対照よりも統計的に有意に高い。例えば、免疫アッセイを実施するとき、対照は、典型的には、抗体または抗原結合断片を単独（すなわち、抗原の不在下で）含有する反応ウェル/管を含み、抗原の不在下における抗体またはその抗原結合断片による反応度（例えば、ウェルへの非特異的結合）の量は、バックグラウンドであると考えられる。結合は、酵素免疫アッセイ（例えば、ELISA）、免疫プロットアッセイ等）を含む、当該技術分野において標準的な多様な方法を使用して、測定することができる。

10

【0120】

結合分子には、抗体、アプタマー、及び抗体断片を含む。本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、抗原上に存在するエпитープに結合することができる免疫グロブリン分子を指す。本用語は、モノクローナル及びポリクローナル抗体等の無傷の免疫グロブリン分子だけではなく、二重特異性抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗特異性（抗ID）抗体、一本鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、融合タンパク質、及び必要とされる特異性の抗原認識部位を含む前述の任意の修飾物も包含することが意図される。本明細書で使用される場合、アプタマーは、標的上で望ましい作用を有する天然に生じない核酸である。望ましい作用には、標的への結合、標的を触媒活性的に変化させること、標的もしくはその標的の機能的活性を修飾する/変化させるように標的と反応すること、自滅阻害剤（suicide inhibitor）のように標的と共有結合すること、標的と別の分子との間の反応を促進することが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、作用は、標的分子に対する特異的結合親和性であり、そのような標的分子は、大部分はワトソン/クリック塩基対または三重らせん結合によるものである機構を通して核酸リガントに結合するポリヌクレオチド以外の3次元化学構造であり、核酸リガントは、標的分子によって結合される既知の生理機能を有する核酸ではない。

20

【0121】

1つの態様では、本開示は、SNPマーカー、または前述の成分（例えば、マーカー遺伝子でコードされたポリペプチドを含むタンパク質）を含む分子に特異的に結合する抗体またはアプタマーを提供する。

30

【0122】

別の実施形態では、本開示は、マーカー遺伝子と実質的な配列同一性を有するポリペプチドまたは前述のポリペプチドを含む分子に特異的に結合する抗体またはアプタマーを提供する。

【0123】

別の実施形態では、本開示は、本明細書に提供される表中で特異的に特定されるマーカーとは構造的に異なるが、同じ（またはほぼ同じ）機能もしくは特性を有するポリペプチドマーカーもしくはポリヌクレオチドマーカー、または前述の成分を含む分子に特異的に結合する抗体またはアプタマーを提供する。

40

【0124】

本開示の別の実施形態は、間質性肺炎に罹患する個体において差次的に発現されるバイオマーカーの発現の検出のための複数のアプタマー、抗体、またはそれらの抗原結合断片に関する。複数のアプタマー、抗体、またはそれらの抗原結合断片は、間質性肺疾患に罹患する個体中で差次的に発現されるタンパク質に選択的に結合する抗体またはその抗原結合断片から成り、抗体を使用してタンパク質生成物として検出され得る。加えて、複数のアプタマー、抗体、またはそれらの抗原結合断片は、本明細書に提供される表からの遺伝子のうちのいずれかによってコードされるタンパク質またはその部分（ペプチド）に選択

50

的に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0125】

本開示に従って、複数のアプタマー、抗体、またはそれらの抗原結合断片は、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるバイオマーカーの全てを表す抗体またはそれらの抗原結合断片を含む、抗体またはそれらの抗原結合断片の、1個単位で、少なくとも2個、及びより好ましくは、少なくとも3個、及びより好ましくは、少なくとも4個、及びより好ましくは、少なくとも5個、及びより好ましくは、少なくとも6個、及びより好ましくは、少なくとも7個、及びより好ましくは、少なくとも8個、及びより好ましくは、少なくとも9個、及びより好ましくは、少なくとも10個等から任意の好適な数までを指す。

10

【0126】

本開示のポリペプチドマーカーポリヌクレオチドマーカーに特異的に結合するある特定の抗体は、既に既知であるか、及び/または商業的供給源から購入可能であってもよい。任意の事象では、本開示の抗体は、当該技術分野で既知の任意の好適な手段によって調製され得る。例えば、抗体は、動物宿主にマーカーまたはその免疫原性断片で免疫を与えることによって調製され得る（必要に応じて、担体に共役される）。免疫学的応答を上昇させるために、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント）が、任意に使用されてもよい。抗原性決定基に対する高親和性を有するポリクローナル抗体を含有する血清は、次いで、免疫化された動物から単離され、精製され得る。

20

【0127】

あるいは、免疫化宿主からの抗体産生組織が収集され、臓器から調製される細胞ホモジネートは、培養癌細胞と融合することができる。マーカーに特異的なモノクローナル抗体を生成するハイブリッド細胞が選択されてもよい。あるいは、本開示の抗体は、化学的合成によって、または組み換え発現によって生成され得る。例えば、抗体をコードするポリヌクレオチドを使用して、抗体の生成のための発現ベクターを構築することができる。本開示の抗体は、当該技術分野で既知の種々のファージディスプレイ法を使用して生成され得る。

【0128】

本開示のマーカーに特異的に結合する抗体またはアプタマーは、例えば、当該技術分野で周知の方法及び技法を使用する本開示のバイオマーカーを検出するための方法において使用され得る。いくつかの実施形態では、例えば、抗体は、検出分子または部分（例えば、染料及び酵素）と共役し、本開示のマーカーを検出するためのELISAまたはサンドイッチアッセイにおいて使用され得る。

30

【0129】

別の実施形態では、本開示のポリペプチドマーカーまたはポリヌクレオチドマーカーに対する抗体またはアプタマーを使用して、マーカーに対する組織試料（例えば、薄い大脳皮質スライス）をアッセイすることができる。抗体またはアプタマーは、マーカーが組織切片中に存在する場合は、そこに特異的に結合することができ、組織中のマーカーの局在化を可能にする。同様に、放射性同位体で標識される抗体またはアプタマーは、インビボ撮像または治療用途のために使用され得る。

40

【0130】

本開示の別の態様は、本開示のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドマーカー、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドマーカー（例えば、抗体もしくはアプタマー）に特異的な結合分子、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドマーカーの阻害剤、またはポリペプチドマーカーもしくはポリヌクレオチドマーカーのレベルまたは活性を上昇させるか、または減少させることができる他の分子を含む、組成物を提供する。そのような組成物は、治療に使用するために製剤化された薬学的組成物であってもよい。

【0131】

あるいは、本開示は、本発明のマーカーの断片、修飾、前駆体、もしくは後続体（successor）である成分または前述の成分を含む分子に対する成分を含む組成物を提

50

供する。

【0132】

別の実施形態では、本開示は、前述のポリヌクレオチドを含むポリペプチドまたは分子に結合するポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。

【0133】

別の実施形態では、本開示は、前述の抗体もしくはアプタマーを含むポリペプチドまたは分子に特異的に結合する抗体もしくはアプタマーを含む組成物を提供する。

【0134】

遺伝的変異体を検出するための方法

本開示はまた、本開示のバイオマーカーを検出する方法も提供する。本開示の実践は、別途指示のない限り、当該技術分野の範囲内の分析生化学、微生物学、分子生物学、及び組み換えDNA技法の従来的方法を用いる。このような技法は文献中で十分に説明される。(例えば、Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 2000、DNA Cloning: A Practical Approach, Vol. I & II (D. Glover, ed.), Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., Current Edition), Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition), Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition), CRC Handbook of Parvoviruses, Vol. I & II (P. Tijessen, ed.), Fundamental Virology, 2nd Edition, Vol. I & II (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds.)を参照されたい)。

【0135】

本発明の方法は、遺伝的変異体(例えば、SNP)の存否を検出するいかなる特定の方法にも限定されず、いかなる好適な方法をも使用して変異体(複数可)の存否を検出することができ、その多数の検出方法が当該技術分野で既知である。動的対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション(DASH)を使用して、遺伝的変異体を検出することができる。DASH遺伝子型決定は、ミスマッチ塩基対の不安定性に起因するDNA中の融解温度の差異を活用する。プロセスは大幅に自動化され得、いくつかの単純な原理を含む。故に、本明細書に記載の態様及び実施形態は、間質性肺疾患に罹患するかまたはそれを発症することが疑われる(例えば家族歴により)対象からの試料(例えば、生体試料)におけるSNPの存否を評定するための方法を提供する。ある特定の実施形態では、1つ以上のSNPを、対象からの1つ以上の試料中でスクリーニングする。SNPは、本明細書に開示のように、1つ以上の遺伝子、例えば、粘液性分泌物と関連する1つ以上の遺伝子または他の遺伝子と関連し得る。

【0136】

典型的には、標的のゲノム分節を、例えばビオチン化プライマーの使用及びクロマトグラフィーによって、非標的配列から増幅及び分離させる。特定の対立遺伝子に特異的なプローブを増幅産物に付加する。変異体配列または優勢対立遺伝子配列に特異的にハイブリダイズするようにプローブを設計することができる。プローブは、2本鎖DNAと結合するときに蛍光を発する分子で標識するか、またはその存在下で付加することができる。その後、T_mを決定し得るまで、温度が上昇する間にシグナル強度を測定する。不一致配列(プローブ設計に応じて、遺伝子変異体または優勢対立遺伝子のいずれか)は、期待を下回るT_mをもたらすことになる。

【0137】

DASH遺伝子型決定はT_mの定量可能な変化に依存するため、SNPだけでなく多く

の型の突然変異を測定することができる。DASHの他の利点としては、標識していないプローブと動作するその能力、ならびにその単純な設計及び性能条件が挙げられる。

【0138】

分子指標もまた、遺伝的変異体を検出するために使用することができる。この方法は、特別に操作した1本鎖オリゴヌクレオチドプローブを使用する。オリゴヌクレオチドは、各末端に相補領域があり、間にプローブ配列が位置するように設計する。この設計により、その天然の単離状態にあるヘアピンまたはステムループ構造を帯びることが可能となる。蛍光色素分子がプローブの一端に、蛍光消光剤がもう一端に結合される。プローブのステムループ構造により蛍光色素分子は消光剤にごく近接しているため、分子が一切の蛍光を発することを防止する。また、プローブ配列のみが標的のゲノムDNA配列に相補的であるように、分子を操作する。

10

【0139】

アッセイ中に分子指標のプローブ配列がその標的ゲノムDNA配列に遭遇すると、プローブ配列はアニール及びハイブリダイズする。プローブ配列の長さによって、プローブのヘアピン分節は、より長くより安定したプローブ標的ハイブリッドの形成に有利なように変性することになる。この構造変化は、蛍光色素分子及び蛍光消光剤がヘアピン関連性に起因するそれらの密接な近接を持たないようにし、それにより分子が蛍光を発することを可能にする。

【0140】

一方で、プローブ配列が、わずか1つの非相補的ヌクレオチドしか持たない標的配列に遭遇すると、分子指標はその天然のヘアピン状態に優先的に留まり、蛍光は、蛍光色素分子が消光したままであるため、観察されないだろう。これら分子指標の特有の設計は、所与の位置でSNPを特定するための単純な診断アッセイを可能にする。ある分子指標を野生型対立遺伝子に一致するように設計し、別の分子指標を対立遺伝子の突然変異体に一致するように設計する場合、この2つを使用して、個体の遺伝子型を特定することができる。第1のプローブの蛍光色素分子の波長のみがアッセイ中に検出される場合には、その個体は野生型と同型である。第2のプローブの波長のみが検出される場合には、個体は突然変異対立遺伝子と同型である。最後に、両波長が検出される場合には、両分子指標はそれらの相補体にハイブリダイズしているに違いないため、個体は両対立遺伝子を含み、かつヘテロ接合型であるに違いない。

20

30

【0141】

マイクロアレイを使用して遺伝的変異体を検出することもできる。数十万ものプローブを小型チップ上にアレイ化することができ、それにより多くの遺伝的変異体またはSNPを同時に詮索することが可能となる。SNP対立遺伝子は1つのヌクレオチドにおいてのみ異なるため、及びアレイ上の全プローブに対して最適なハイブリダイゼーション条件を達成することは困難であるため、標的DNAは、ミスマッチプローブにハイブリダイズする可能性を有する。これは、いくつかの余剰プローブを使用して各SNPを詮索することにより対処することができる。プローブは、いくつかの異なる位置でSNP部位を有し、かつSNP対立遺伝子とのミスマッチを含むように設計することができる。標的DNAのハイブリダイゼーションの差異量をこれら余剰プローブの各々と比較することによって、特異的なホモ接合型及びヘテロ接合型対立遺伝子を決定することが可能である。

40

【0142】

制限断片長多型法(RFLP)を使用して、遺伝的変異体及びSNPを検出することができる。RFLPは、多くの異なる制限エンドヌクレアーゼ、ならびに特有及び特異的な制限部位へのそれらの高い親和性を使用する。ゲルアッセイによってゲノム試料に対する指定及び断片長の決定を実施することで、酵素が期待した制限部位を切断するか否かを解明することが可能である。ゲノム試料の切断の失敗は、期待を上回って特定可能に大型である断片をもたらし、それは、ヌクレアーゼ活性からの保護を与えている、制限部位の地点で突然変異があることを示す。

【0143】

50

PCR的及び増幅的方法を使用して、遺伝的変異体を検出することができる。例えば、テトラプライマーPCRは、プライマーの2つの対を用いて、1回のPCR反応で2つの対立遺伝子を増幅する。プライマーは、2つのプライマー対がSNP位置で重複するが、各々は可能性のある対立遺伝子のうちの1つにのみ完全に一致するように設計する。結果として、所与の対立遺伝子がPCR反応中に存在する場合、異なる対立遺伝子配列を持つ代替対立遺伝子ではなく、その対立遺伝子に特異的であるプライマー対が、産物を産生する。2つのプライマー対は、それらのPCR産物が有意に異なる長さのものであることで、ゲル電気泳動によって容易に区別できるバンドを可能にするように、またはそれらが異なって標識されるように、設計することができる。

【0144】

10

プライマー伸長を使用して遺伝的変異体を検出することもできる。プライマー伸長は、まず、SNPヌクレオチドのすぐ上流にある塩基へのプローブのハイブリダイゼーション、次に、SNPヌクレオチドに相補的である塩基を付加することによってDNAポリメラーゼがハイブリダイズしたプライマーを伸長させるという「ミニ配列決定」反応を伴う。検出される組み合わせられた塩基が、SNP対立遺伝子の存否を決定する。プライマー伸長は高精度のDNAポリメラーゼ酵素に基づくため、本方法は概して信頼性が高い。プライマー伸長は、酷似した反応条件下で大部分のSNPを遺伝子型決定することができるため、柔軟性も高い。プライマー伸長は、ある数のアッセイ形式において使用され、例えば、蛍光標識または質量分析を使用して検出することができる。

【0145】

20

プライマー伸長は、蛍光で標識したddNTPまたは蛍光で標識したデオキシヌクレオチド(ddNTP)のいずれかの組み込みを伴うことができる。ddNTPでは、プローブは、SNPヌクレオチドのすぐ上流にある標的DNAにハイブリダイズし、単独の、SNP対立遺伝子に相補的なddNTPが、プローブの3'末端に付加される(ジデオキシヌクレオチド中の欠けている3'-ヒドロキシルは、さらにヌクレオチドが付加されることを防止する)。各ddNTPを異なる蛍光シグナルで標識することで、同一の反応中での4つ全ての対立遺伝子の検出が可能となる。ddNTPでは、対立遺伝子特異的プローブは、詮索されるSNP対立遺伝子の各々に相補的である3'塩基を有する。標的DNAがプローブの3'塩基に相補的な対立遺伝子を含む場合、標的DNAはプローブに完全にハイブリダイズすることになり、DNAポリメラーゼがプローブの3'末端から伸長することを可能にする。これは、プローブの末端上への蛍光で標識したddNTPの組み込みによって検出される。標的DNAがプローブの3'塩基に相補的な対立遺伝子を含まない場合、標的DNAは、プローブの3'末端でミスマッチを産生することになり、DNAポリメラーゼは、プローブの3'末端から伸長することができなくなる。

30

【0146】

iPLEX(登録商標)SNP遺伝子型決定方法は、わずかに異なる手法を取り、質量分析計による検出に頼る。伸長プローブは、多くの異なるSNPアッセイをPCR混液中で増幅及び分析できるようなやり方で設計する。伸長反応は、上記のようにddNTPを使用するが、SNP対立遺伝子の検出は、蛍光分子ではなく伸長産物の実際の質量に依存する。この方法は、低～中位のハイスループットに対してであり、ゲノムワイド発見向けではない。

40

【0147】

しかしながら、プライマー伸長方法はハイスループット分析に適している。プライマー伸長プローブはスライド上にアレイ化することができるため、多くのSNPを一度に遺伝子型決定することが可能となる。アレイ化プライマー伸長(APEX)として広義に言及されるこの技術は、プローブの示差ハイブリダイゼーションに基づく方法と比べていくつかの利点を有する。比較的、DNAマイクロアレイ上の数千ものプローブに対して最適なハイブリダイゼーション条件を得ることが多くの場合に不可能であるため(通常これは極めて余剰なプローブを有することによって対処される)、APEX方法は、示差ハイブリダイゼーションを使用する方法よりも卓越した識別力を持つ。

50

【0148】

オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイを使用して遺伝的変異体を検出することもできる。DNAリガーゼは、直に隣接するDNA断片の5'末端へのDNA断片の3'末端のライゲーションを触媒する。この機序を使用して、SNP多型性部位の真上で2つのプローブを直接ハイブリダイズさせることで、プローブが標的DNAと同一である場合にライゲーションを起こすことにより、SNPを詮索することができる。例えば、標的DNAに、その3'塩基がSNPヌクレオチドの真上に位置するようにハイブリダイズする対立遺伝子特異的プローブ、及びライゲーション反応のための5'末端を提供する、SNP多型性部位の上流（相補鎖における下流）にある鋳型をハイブリダイズする第2のプローブという、2つのプローブを設計することができる。対立遺伝子特異的プローブが標的DNAに一致する場合、それは標的DNAに十分にハイブリダイズし、ライゲーションが起こる。ライゲーションは概して、ミスマッチの3'塩基の存在下では起こらない。ライゲーションした、またはライゲーションしていない産物は、ゲル電気泳動、MALDI-TOF質量分析によって、またはキャピラリー電気泳動によって、検出することができる。

10

【0149】

Taq DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性は、遺伝的変異体の検出に使用することができる。アッセイはPCR反応と同時に行い、結果をリアルタイムで読取ることができる。アッセイは、SNP多型性部位を含む領域を増幅する正及び逆PCRプライマーを必要とする。対立遺伝子の識別は、FRET、及びSNP多型性部位にハイブリダイズする1つまたは2つの対立遺伝子特異的プローブを使用して達成する。プローブは、それらの5'末端に連結した蛍光色素分子と、それらの3'末端に連結した蛍光消光剤分子とを有する。プローブが無傷である間、蛍光消光剤は、蛍光色素分子にごく近接したままとなることで、蛍光色素分子のシグナルを排除する。PCR増幅ステップ中に、対立遺伝子特異的プローブがSNP対立遺伝子に完全に相補的である場合、それは標的DNA鎖と結合し、その後、それがDNAをPCRプライマーから伸長させるときに、Taqポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性によって分解される。プローブの分解は、蛍光消光剤分子からの蛍光色素分子の分離をもたらすことで、検出可能なシグナルを生成する。対立遺伝子特異的プローブが完全に相補的ではない場合、それは、より低い融解温度を有し、さほど効率的には結合しないこととなる。これは、ヌクレアーゼがプローブに作用することを防止する。

20

30

【0150】

フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）検出は、プライマー伸長、及び2つの標識を相互にごく近接させるライゲーション反応における検出に使用することができる。それは、5'ヌクレアーゼ反応、分子指標反応、及び近隣ドナー/アクセプター対がそれらをまとめているステムループ構造の開裂または断絶によって分離される侵入的開裂反応に使用することもできる。FRETは、2つの条件が満たされるときに起こる。第1に、蛍光ドナー染料の発光スペクトルは、アクセプター染料の励起波長と重複する必要がある。第2に、エネルギー移動は距離と共に急速に下降するため、2つの染料は相互にごく近接している必要がある。FRETは、この近接要件のために、ある数の対立遺伝子識別機序のための優れた検出方法なのである。

40

【0151】

種々の染料をFRETに使用することができ、それらは当該技術分野で既知である。最も一般的なものは、フルオレセイン、シアニン染料（Cy3～Cy7）、ローダミン染料（例えばローダミン6G）、Alexaシリーズの染料（Alexa 405～Alexa 730）である。これらの染料の一部は、FRETネットワークで使用されている（複数のドナー及びアクセプターを持つ）。これら全てを撮像するための光学は、UVから近IR（例えばAlexa 405～Cy7）までの検出、及びAttoシリーズの染料（Atto-Tec GmbH）を必要とする。InvitrogenからのAlexaシリーズの染料は、全スペクトル域を網羅する。これらは非常に鮮やかかつ光安定性である。

50

【0152】

FRET標識化のための例示的な染料対としては、Alexa-405/Alexa-488、Alexa-488/Alexa-546、Alexa-532/Alexa-594、Alexa-594/Alexa-680、Alexa-594/Alexa-700、Alexa-700/Alexa-790、Cy3/Cy5、Cy3.5/Cy5.5、及びRhodamine-Green/Rhodamine-Redなどが挙げられる。銀及び金ナノクラスターなどの蛍光金属ナノ粒子も使用することができる(Richards et al. (2008) J Am Chem Soc 130:5038-39、Vosch et al. (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104:12616-21、Petty and Dickson (2003) J Am Chem Soc 125:7780-81)。利用可能なフィルター、ダイクロイックミラー、マルチクロイックミラー、及びレーザーが、染料の選択に影響し得る。

10

【0153】

ポリヌクレオチド及びポリペプチド発現レベルを含むマーカーを検出する方法

本開示のマーカーは、LC-MS、GC-MS、免疫アッセイ、ハイブリダイゼーション、及び酵素アッセイを含むがこれらに限定されない、当業者に既知の任意の方法によって検出し得る。検出は、定量的または定性的であってもよい。質量分析、クロマトグラフィーによる分離、2-Dゲル分離、結合アッセイ(例えば免疫アッセイ)、競合的阻害アッセイなどを含む、多種多様な従来の技法が利用可能である。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの存否、レベル、または活性を測定するための当該技術分野において有効な一切の方法が、本開示に含まれる。いずれの方法が特定のマーカーを測定するのに最も適切であり得るのかを決定することは、当業者の能力の範囲内である。故に、例えばELISAアッセイは診療所での使用に最適であり得、一方でより精巧な計装を必要とする測定は臨床検査室での使用に最適であり得る。選択される方法に関わらず、測定が再現可能であることが重要である。

20

【0154】

本開示のマーカーは、高感度及び高再現性を持つ分析物の直接測定を可能にする質量分析によって測定することができる。ある数の質量分析法が利用可能である。例えばエレクトロスプレーイオン化(ESI)は、別のものに対する1つの試料中の種々の種の相対濃度における差異の定量を可能にし、絶対定量は、正規化技法によって(例えば内部標準を使用して)可能となる。マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)または関係するSELDI(登録商標)技術(Ciphergen, Inc.)を使用して、マーカーが存在するか否か、及びマーカーの相対または絶対レベルの決定をすることもできる。飛行時間型(TOF)測定を可能にする質量分析計は、高精度及び高分解能を有し、血清またはCSFなどの複雑なマトリックス中であっても、数の少ない種を測定することができる。

30

【0155】

タンパク質マーカーについては、定量は、同位体コード化親和性タグ(「ICAT」)として言及される同位体標識化と組み合わせた誘導体化に基づき得る。この方法及び他の関係する方法では、2つの試料中の特定のアミノ酸を差次的及び同位体的に標識し、続いて、固相補足、洗浄、及び放出によってペプチドバックグラウンドから分離させる。その後、異なる同位体標識を持つ2つ起源からの分子の強度を、相互に対して正確に定量することができる。定量は、測定するものに相似の同位体標識したペプチドまたはタンパク質を急増させることによる同位体希釈法に基づくこともできる。さらに、定量は、同様のマトリックスにおける標準の別の測定と比較した分析物の直接強度を使用して、同位体標準なしで決定することもできる。

40

【0156】

加えて、タンパク質を分離させ、銀染色、蛍光、または放射性標識化によるゲルの点を定量するために、1次元及び2次元ゲルが使用されている。異なって染色されたこれらの点は、質量分析を使用して検出され、タンデム質量分析技法によって特定されている。

50

【0157】

1つの実施形態では、液体クロマトグラフィー質量分析またはガスクロマトグラフィー質量分析などの、分離技法に関連した質量分析を使用して、マーカ―を測定する。具体的には、逆相液体クロマトグラフィーを、高分解能、高質量精度ESI飛行時間型(TOF)質量分光法に連結させることにより、比較的少量のいかなる複雑な生体物質からも、数多くの生体分子のスペクトル強度測定が可能となる。この形での試料の分析が、マーカ―(特定のRT及びm/zを特徴とする)を決定し定量することを可能にする。

【0158】

当業者には理解されるだろう通り、多くの他の分離技術を、質量分析と関連して使用し得る。例えば、多岐にわたる分離カラムが市販されている。加えて、分離は、特注のクロマトグラフィー表面(例えば、マーカ―特異性試薬が固定化されたビーズ)を使用して実施してもよい。続いて媒体上に保持された分子を、質量分析による分析のために溶出させ得る。

10

【0159】

液体クロマトグラフィー-質量分析による分析は質量強度スペクトルを提供し、そのピークは試料の種々の成分を表し、各成分は特徴的な質量対電荷比(m/z)及び保持時間(RT)を有する。マーカ―のm/z及びRTを持つピークの存在は、マーカ―が存在することを示す。マーカ―を表すピークを、別のスペクトルからの(例えば、対照試料からの)対応するピークと比較して、相対測定を得てもよい。定量的測定が所望の場合は、当該技術分野における任意の正規化技法(例えば、内部標準)を使用し得る。「逆たたみ込み」ソフトウェアが、重複しているピークを分離させるために利用可能である。保持時間は、液体クロマトグラフィー分離の実施に用いられる条件にある程度依存する。表に見られる保持時間を得るために使用される好適な条件を実施例に示す。質量分析計は、高質量精度及び高質量分解能を提供することが好ましい。例えば、較正の取れたMicromass TOF計器の質量精度はおよそ5 mDaであると報告され、分解能m/mは5000を超過する。

20

【0160】

一部の実施形態では、マーカ―のレベルは、一致抗体対及び化学発光検出を使用するサンドイッチELISAなどの標準的な免疫アッセイを使用して決定し得る。市販または特注のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を典型的には使用する。しかしながら、アッセイは、マーカ―と特異的に結合する他の試薬との使用に適合させることができる。標準的なプロトコル及びデータ分析を使用して、アッセイデータからのマーカ―濃度を決定する。

30

【0161】

上で考察したある数のアッセイは、マーカ―と特異的に結合する試薬を用いる。マーカ―と特異的に結合することができるいずれの分子もが本開示内に含まれる。一部の実施形態では、結合分子は抗体または抗体断片である。他の実施形態では、結合分子は、アプタマーなどの非抗体種である。故に、例えば、結合分子は酵素であってもよく、マーカ―はそのための基質である。結合分子は、標的マーカ―のいかなるエピトープをも認識し得る。

40

【0162】

上記のように、結合分子は、当該技術分野で認められているいずれの方法によっても特定及び産生し得る。分析物に特異的な抗体及び抗体断片を特定及び産生するための方法は周知である。結合分子を特定するために使用される他の方法の例としては、フランドムペプチドライブラリ(例えば、ファージディスプレイ法)を用いた結合アッセイ、及びマーカ―の構造の分析に基づく設計方法が挙げられる。

【0163】

本開示のマーカ―も、当該技術分野で既知のある数の化学的誘導体化または反応技法を使用して検出または測定し得る。このような技法における使用のための試薬は当該技術分野で既知であり、ある特定のクラスの標的分子に対して市販されている。

50

【0164】

最後に、上記のクロマトグラフィー分離技法はまた、タグ付き分子の蛍光検出、NMR、キャピラリーUV、蒸発光散乱または電気化学検出などの、質量分析以外の分析技法と連結させてもよい。

【0165】

本開示のRNAまたはタンパク質マーカーの相対量の測定は、当該技術分野で既知のいずれの方法によってもよい（例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989、及びCurrent Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照されたい）。RNA検出のための典型的な方法論は、細胞または組織試料からのRNAの抽出、続く標的RNAに特異的な標識したプローブ（例えば、相補的ポリヌクレオチド）の抽出したRNAへのハイブリダイゼーション、及びプローブの検出（例えば、ノーザンブロット）を含む。タンパク質検出のための典型的な方法論は、細胞または組織試料からのタンパク質の抽出、続く標的タンパク質に特異的な標識したプローブ（例えば、抗体）のタンパク質試料へのハイブリダイゼーション、及びプローブの検出を含む。標識群は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であることができる。特定のタンパク質及びポリヌクレオチドの検出はまた、当業者に周知の多くの他の技法の中でも、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、直接配列決定、または定量的PCR（ポリヌクレオチドの場合）などによっても評定し得る。

【0166】

本開示のマーカー遺伝子の全てまたは一部のコピーの存在または数の検出は、当該技術分野で既知である任意の方法を使用して実施し得る。典型的には、サザン解析によってDNAまたはcDNAの存在及び/または量を評定することが簡便であり、この解析では、細胞または組織試料からの総DNAを抽出し、標識したプローブ（例えば相補的DNA分子）とハイブリダイズさせ、プローブを検出する。標識群は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であることができる。DNA検出及び/または定量的他の有用な方法としては、当業者に既知であるように、直接配列決定、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、及び定量的PCRが挙げられる。

【0167】

ポリヌクレオチドは、同様に、相補的または部分相補的配列を持つ一本鎖核酸間のハイブリダイゼーションによって評価することができる。このような実験は当該技術分野で周知である。本明細書で言及する高厳密性のハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、ハイブリダイゼーション反応中のプローブに使用される核酸分子との少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子の単離を許す条件（すなわち、約20%以下の核酸のミスマッチを許す条件）を指す。

【0168】

本明細書で言及する超高厳密性のハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、ハイブリダイゼーション反応中のプローブに使用される核酸分子との少なくとも約90%の核酸配列同一性を有する核酸分子の単離を許す条件（すなわち、約10%以下の核酸のミスマッチを許す条件）を指す。上で考察したように、当業者は、Meinkothら同書中の式を使用して、これら特定のレベルのヌクレオチドミスマッチを達成するために適切なハイブリダイゼーション及び洗浄条件を算出することができる。このような条件は、DNA:RNAハイブリッドが形成されるのか、DNA:DNAハイブリッドが形成されるのかに応じて異なることになる。算出したDNA:DNAハイブリッドについての融解温度は、DNA:RNAハイブリッドより10℃低い。特定の実施形態では、DNA:DNAハイブリッドに対するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、適切な洗浄条件をも

って、約 20 ～ 約 35 (低ストリンジェンシー)、より好ましくは約 28 ～ 約 40 (よりストリンジェント)、さらにより好ましくは約 35 ～ 約 45 の温度 (さらは一層ストリンジェント) で、6 倍 SSC (0.9 M Na⁺) のイオン強度でのハイブリダイゼーションを含む。特定の実施形態では、DNA:RNA ハイブリッドに対するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、同様に適切な洗浄条件をもって、約 30 ～ 約 45 、より好ましくは約 38 ～ 約 50 、さらにより好ましくは約 45 ～ 約 55 の温度で、6 倍 SSC (0.9 M Na⁺) のイオン強度でのハイブリダイゼーションを含む。これらの値は、約 100 個のヌクレオチドより大きい分子、0% のホルムアミド、及び約 40% の G + C 含有量に対する融解温度の算出に基づく。あるいは、T_mは、Sambrook et al., supra, pages 9.31 ~ 9.62 に示されるように、実験的に算出することができる。概して、洗浄条件は可能な限りストリンジェントであるべきであり、選択したハイブリダイゼーション条件に対して適切であるべきである。例えば、ハイブリダイゼーション条件は、特定のハイブリッドの算出した T_m をおよそ 20 ~ 25 下回る塩及び温度条件の組み合わせを含むことができ、洗浄条件は、典型的には、特定のハイブリッドの算出した T_m をおよそ 12 ~ 20 下回る塩及び温度条件の組み合わせを含む。DNA:DNA ハイブリッドとの使用に好適なハイブリダイゼーション条件の一例としては、約 42 の 6 倍 SSC (50% のホルムアミド) 中での 2 ~ 24 時間のハイブリダイゼーション、続く約 2 倍の SSC における室温での 1 回以上の洗浄を含む洗浄ステップ、続くより高温及びより低いイオン強度でのさらなる洗浄 (例えば、約 0.1 倍 ~ 0.5 倍の SSC における約 37 での少なくとも 1 回の洗浄、続く約 0.1 倍 ~ 0.5 倍の SSC における約 68 での少なくとも 1 回の洗浄) が挙げられる。他のハイブリダイゼーション条件、及び例えば、核酸アレイとの併用で最も有用なもの、当業者には既知であるだろう。

【0169】

間質性肺疾患の診断、モニタリング、及び治療

本開示は、間質性肺炎、特発性間質性肺炎、家族性間質性肺炎、特発性肺線維症などの間質性肺疾患の診断方法、異なる型の間質性肺疾患の間での患者の層別化方法、及び/または同様の症状を引き起こし、胸部レントゲン写真上で同様の異常を示す他の型の肺疾患の除外方法、ならびに関係する方法を含む。概して、本明細書に記載のバイオマーカーは、間質性肺疾患の他の兆候、症状、及び、レントゲン写真、肺組織の病理学的評価、または文献中で報告される間質性肺疾患バイオマーカーなどの臨床検査と組み合わせて測定されることが期待される。同じく、2 つ以上の本開示のバイオマーカーを組み合わせて測定してもよい。本開示のバイオマーカー、及び本明細書に特別に列挙されていないマーカーを含む当該技術分野で既知の任意の他のマーカーの測定は、本開示の範囲内にある。この実施形態に適切なマーカーとしては、正常または対照試料からの試料と比較して、生体、及び特に肺試料から得た試料中に存在するか、または試料中で増加すると特定されたマーカーが挙げられる。この実施形態に適切な他のマーカーとしては、このようなマーカーの断片、前駆体、後続体 (successor)、及び修飾型、このようなマーカーと相当な配列同一性を有するポリペプチドが挙げられる。この実施形態に適切な他のマーカーは、本明細書の開示を踏まえて当業者には明らかとなるだろう。

【0170】

「間質性肺疾患」または「ILD」という用語は、当該技術分野におけるその平易かつ通常の意味に従って本明細書で使用される。間質性肺疾患は、間質に影響を及ぼす肺疾患である。ILD は、息切れ、慢性咳嗽、疲労及び衰弱、食欲減退、ならびに/または急速な喪失を特徴とし得る。本明細書に記載の態様または実施形態がILDに言及する場合、ILD はIIPであってもよい。本明細書に記載の態様または実施形態がILDに言及する場合、ILD はFIPであってもよい。本明細書に記載の態様または実施形態がILDに言及する場合、ILD はIPFであってもよい。本明細書に記載の態様または実施形態がILDに言及する場合、ILD はIIPであってもよい。さらなる線維性肺疾患としては、急性間質性肺炎 (AIP)、呼吸細気管支炎関連性間質性肺疾患 (RBILD)、剥

10

20

30

40

50

離性間質性肺炎 (DIP)、非特異的間質性肺炎 (NSIP)、特発性器質化肺炎 (BOOP) が挙げられる。AIP は、急速進行性かつ組織学的に独特な形の間質性肺炎である。病理学的パターンは、既知の原因の急性呼吸促迫症候群 (ARDS) 及び他の急性間質性肺炎においても見出されるびまん性肺胞障害 (DAD) の器質化形態である (Clinical Atlas of Interstitial Lung Disease (2006 ed.) pp 61 - 63 を参照されたい)。

【0171】

RBILD は、喫煙者における呼吸細気管支の炎症性病変を特徴とする。RBILD の組織学的所見は、呼吸細気管支及び周囲の気腔内の色素沈着したマクロファージの蓄積、気管支周囲の線維化した肺胞中隔の可変的な肥厚、及びわずかに関連した肺壁の炎症を特徴とする (Wells et al. (2003) Sem Respir. Crit. Care Med. vol. 24 を参照されたい)。

10

【0172】

DIP は、間質性炎症及び/または線維症と関連する肺胞腔における大量のマクロファージの蓄積を特徴とする稀な間質性肺疾患である。マクロファージは、頻繁に淡褐色色素を含有する。リンパ結節は一般的であり、疎らではあるが独特の好酸球浸潤物である。DIP は喫煙者に最も一般的である (Tazelaar et al. (Sep. 21, 2010) Histopathology を参照されたい)。

【0173】

NSIP は、短期間にわたって現れる均一な間質性炎症及び線維症を病理学的に特徴とする。NSIP は、その予後が概して良好であるという点で、他の間質性肺疾患とは異なる。加えて、NSIP に見られる実質性変化の一時的均一性は、通常の間質性肺炎の一時的不均一性と著しい対照を成す (Coche et al. (2001) Brit J Radio 174: 189 を参照されたい)。

20

【0174】

BOOP は、NSIP とは異なり、最初の急性症状から数日以内に致死的となり得る。それは急性呼吸促迫症候群の急激な発症を特徴とするため、臨床的に、急速進行性BOOP は急性間質性肺炎と区別不能であり得る。組織学的特徴としては、肉芽組織を形成し、末梢気道及び肺胞腔を塞ぐ単核性炎症細胞塊が挙げられる。肉芽組織のこれらの栓は、肺胞管内を移動するポリープを形成し得るか、または壁に局部的に付着し得る。(White & Ruth - Saad (2007) Crit. Care Nurse 27: 53 を参照されたい)。

30

【0175】

これらの疾患に対して利用可能な特徴及び療法についてのさらなる詳細は、例えば、米国肺協会のウェブサイト lungusa.org/lung-disease/pulmonary-fibrosis で見出すことができる。肺障害の診断的指標としては、生検 (例えば、VATS または外科的肺生検)、高分解能コンピュータ断層撮影法 (HRTC)、または、努力性呼気量 (FEV1)、肺活量 (VC)、努力性肺活量 (FVC)、及び FEV1 / FVC などの呼吸計量が挙げられる。

【0176】

40

突発性間質性肺炎 (IIP) としては、突発性肺線維症及び家族性間質性肺炎 (FIP) を挙げることができる。突発性間質性肺炎 (IIP) は、病因不明のびまん性間質性肺疾患の一部である (「突発性」という用語は原因不明を示す)。IIP は、浸潤物を伴う間質画分 (すなわち、上皮基底膜と内皮基底膜との間にサンドイッチされた肺実質の部分) の膨張を特徴とする。浸潤物には、コラーゲン沈着の異常またはコラーゲン合成可能な線維芽細胞の増殖のいずれかの形態にある線維症が付随する。

【0177】

突発性肺線維症 (IPF) は世界中で数千もの人々に発生し、過去 10 年で有病率が倍増している。IPF の発症は、年齢約 50 ~ 70 歳で発生し、進行性の息切れ及び低酸素血症と共に開始する。IPF の平均生存期間は約 3 ~ 5 年である。状態の病因及び発症機

50

序はよく分かっていない。I P F の全症例の約 5 ～ 2 0 パーセントが家族歴を有し、遺伝形質は常染色体優性であるように見える。

【 0 1 7 8 】

対象が間質性肺疾患に罹患しているか否かを決定するための方法を本明細書で提供する。別の態様では、本開示は、対象において間質性肺疾患を診断するための方法を提供する。これらの方法は、間質性肺炎に罹患している疑いがあるか、もしくは間質性肺疾患を発病する危険性のある対象から生体試料を得ること、試料中の 1 つ以上のバイオマーカーの存在もしくはレベルもしくは活性を検出すること、及び結果を、対照もしくは正常対象から得た試料中のマーカー（複数可）の存在、レベル、もしくは活性と、または参照範囲もしくは値と比較することを含む。本明細書で使用される「生体試料」という用語は、一切の体液または組織（例えば、粘液、全血、末梢血単核細胞（P B M C）、血清、血漿、血液、脳脊髄液、尿、唾液、肺組織）からの試料を含む。

10

【 0 1 7 9 】

当業者は、血液試料または口腔粘膜検体が、肺細胞と同一の遺伝子配列情報を担持することが期待されることを理解するだろう。所与の発現レベルの検出に対しては、肺組織試料及び他の生体液を典型的には使用する。生体試料としては、肺粘膜試料、または、血液もしくは血液成分（血漿、血清）、痰、粘液、尿、唾液などの生体液を挙げることができる。肺粘膜試料は、当該技術分野で既知の方法、例えば、気管支上皮ブラシまたは呼気凝縮液を使用して得ることができる。さらなる方法としては、気管支生検、気管支洗浄、気管支肺泡洗浄、全肺洗浄、経内視鏡生検、経咽頭鏡カテーテル、及び経気管洗浄が挙げられる。比較及び安全性の問題を含む一般に使用される技法の概説は、Busse et al. (2005) Am J Respir Crit Care Med 172: 807 - 816 中で提供される。洗浄技法のために、気管支鏡を気道の所望のレベルに挿入することができる。少量の無菌の生理学的に許容される液体（例えば、緩衝生理食塩水）を放出し、即座に吸引する。洗浄物質は、粘膜及び上皮からの細胞を含有する（Riise et al. (1996) Eur Resp J 9: 1665）。気管支上皮ブラシの使用のためには、無菌の無刺激性（例えば、ナイロン）の細胞診ブラシを使用することができる。複数回の擦過を取り、代表試料抽出を確実にすることができる。その後ブラシを生理学的に許容される液体中で攪拌し、常法を使用して細胞及び残屑を分離させる（Riise et al. (1992) Eur Resp J 5: 382）。細胞成分は、当該技術分野で既知の方法、例えば遠心分離を使用して単離することができる。同様に、細胞内成分（例えば、エキソームまたはベシクル）は、既知の方法または市販の分離製品（BioCat, System Bio, Bioscientific などから入手可能）を使用して単離することができる。例示的な方法は、例えば、Thery et al. (2006) Current Prot. Cell Biol によって説明される。

20

30

【 0 1 8 0 】

典型的には、標準バイオマーカーレベルまたは参照範囲は、正常対照の集合における同一のマーカーまたは複数のマーカーを測定することによって得る。標準バイオマーカーレベルまたは参照範囲の測定は、同時期に行う必要はなく、過去の測定であってもよい。正常対照は、一部の属性（複数可）（例えば、年齢）に関して個体に一致することが好ましい。測定したものと標準レベルまたは参照範囲との間の差異に応じて、個体は間質性肺疾患に罹患しているとして、または間質性肺疾患に罹患していないとして診断することができる。一部の実施形態では、個体試料におけるバイオマーカーまたは複数のバイオマーカーの発現レベルが、正常対照と関連付けられているバイオマーカーまたは複数のバイオマーカーの発現レベルよりも、間質性肺疾患と関連付けられているバイオマーカーまたは複数のバイオマーカーの発現レベルの方に統計的により類似している場合に、間質性肺疾患が個体中で診断される。

40

【 0 1 8 1 】

ここで間質性肺疾患として言及されるものは、関係はするが区別である数の状態を含む

50

。分類を行うことができ、これらの型を亜型へとさらに区別してもよい。ありとあらゆる種々の形態の間質性肺疾患が本開示の範囲内であると意図される。実に、バイオマーカー測定レベルに基づいて個体を部分集合化するための方法を提供することにより、本開示の組成物及び方法を使用して、本疾患の種々の形態を発見及び定義し得る。

【0182】

本開示の方法を使用して、個体の症状または他の臨床もしくは準臨床検査の結果などの他の情報から独立して間質性肺炎の診断を行い得る。しかしながら、本開示の方法は、このような他のデータポイントと併せて使用してもよい。

【0183】

診断が単一の検査結果のみに基づくことは稀であるため、本方法を使用して、測定したものとバイオマーカーの標準レベルまたは参照範囲との間の差異に基づいて、対象が間質性肺疾患に罹患している可能性の方が高いのか、または別の疾患に罹患しているよりは間質性肺疾患に罹患している可能性の方が高いのかを決定することができる。故に、例えば、間質性肺疾患の推定診断を受けた個体は、本開示の方法によって提供される情報を踏まえて、間質性肺疾患に罹患している「可能性が高い」または「可能性が低い」として診断され得る。複数のバイオマーカーを測定した場合、対象が間質性肺疾患に罹患している（または罹患している可能性が高い）として診断されるためには、少なくとも1つ及び最大で測定したバイオマーカーの全てが、適切な方向に異なる必要がある。一部の実施形態では、このような差異は統計的に有意である。

【0184】

生体試料は、血清または組織試料を含むいかなる組織または液体のものでもよいが、他の生体液または組織を使用してもよい。可能性のある生体液としては、粘液、全血、末梢血単核細胞（PBMC）、血漿、尿、唾液、及び肺組織が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、マーカーのレベルを、別のマーカー、または、異なる組織、液体、もしくは生体「画分」における一部の他の成分と比較してもよい。故に、組織及び血清中のマーカーの差異比較を行い得る。マーカーのレベルを、同一の画分内の別のマーカーまたは一部の他の成分のレベルと比較することも、本開示の範囲内である。

【0185】

当業者には明らかとなるように、上の説明は、間質性肺疾患の初期診断を行うことに限定されず、間質性肺疾患の暫定診断を確認すること、またはこのような診断を「除外」することにも適用可能である。さらに、間質性肺疾患に罹患している疑いがあるか、または間質性肺疾患を発病する危険性のある（例えば、遺伝的素因を持つ）対象から得た試料中のマーカー（複数可）の増大または低下したレベルまたは活性は、該対象が、間質性肺疾患に罹患しているか、またはそれを発病する危険性があることを示す。

【0186】

診断に基づき、医師は、間質性肺疾患の治療経過をさらに決定することができる。療法の選択肢は限定されるが、緩和措置、充血除去剤、鎮痛剤、免疫抑制、肺移植を含むことができる。加えて、本開示に基づき、治療は、開示のバイオマーカーの発現をより正常なレベルまで減少または是正することを目的とした標的遺伝子または抗体療法を含むことができる。治療は、対象の継続的な監視、例えば、本開示のバイオマーカーの発現レベルの測定、または放射線医学、酸素容量、快適性レベルなどの他の測定に応じて経時的に調整することができる。

【0187】

本開示はまた、間質性肺疾患を発症する対象の危険性を決定するための方法も提供し、該方法は、対象から生体試料を得ること、試料中のマーカーの存在、レベル、または活性を検出すること、及び結果を、非間質性肺疾患対象から得た試料中のマーカーの存在、レベル、または活性と比較するか、あるいはマーカーの存在または増大もしくは減少が間質性肺疾患を発症する危険性と相関する参照範囲または値と比較することを含む。

【0188】

本開示はまた、間質性肺疾患の病期または重症度を決定するための方法も提供し、該方

法は、対象から生体試料を得ること、試料中のマーカーの存在、レベル、または活性を検出すること、及び結果を、正常または対照試料対象から得た試料中のマーカーの存在、レベル、または活性と比較するか、あるいはマーカーの存在または増大もしくは減少が疾患の病期または重症度と相関する参照範囲または値と比較することを含む。

【0189】

別の態様では、本開示は、間質性肺疾患に罹患している対象における疾患の進行を監視するための方法を提供し、該方法は、対象から第1の生体試料を得ること、試料中のマーカーのレベルまたは活性を検出すること、及び結果を、後で対象から得た第2の試料におけるマーカーのレベルもしくは活性と比較するか、またはマーカーの増大が疾患の進行と相関する参照範囲もしくは値と比較することを含む。

10

【0190】

遺伝子マーカーのうちの1つ以上の測定値の上昇における有意な差異は、個体が、間質性肺疾患に罹患している（または罹患している可能性がある、または罹患の危険性がある、または発病の危険性がある、または進行性のものを発病する高い危険性がある）ことを示す。1つのバイオマーカーのみを測定する場合には、間質性肺疾患を示すためにはその値が増加する必要がある。2つ以上のバイオマーカーを測定する場合には、間質性肺炎の診断は、1つのバイオマーカーのみ、全てのバイオマーカー、またはその間の任意の数における変化によって示され得る。一部の実施形態では、複数のマーカーを測定し、間質性肺疾患の診断は、複数のマーカーにおける変化によって示される。例えば、マーカーのパネルは、間質性肺疾患対象の試料におけるレベルまたは活性が、非間質性肺疾患対象の試料と比較して増大するマーカーを含んでもよい。測定は、(i)本開示のバイオマーカー、(ii)本開示のバイオマーカー、及び間質性肺疾患と関連付けられることが知られている別の因子（例えば、CTスキャン）、(iii)本開示の複数のバイオマーカー、(iv)少なくとも1つの本開示のバイオマーカー及び少なくとも1つの文献中で報告されるバイオマーカーを含む複数のバイオマーカー、(v)本開示のバイオマーカーまたは複数のバイオマーカー、及び、個体の年齢、病理学的評価結果を含み得る少なくとも1つの臨床的共変量、(vi)前述のものの任意の組み合わせの測定であることができる。さらに、バイオマーカーレベルの変化量は、疾患の進行の相対的確立の兆候となり得る。

20

【0191】

マーカー（複数可）は、当該技術分野で既知の任意の好適な方法（例えば、免疫アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ）によって、対象から得たいずれの生体試料においても検出し得る。マーカー（複数可）は、個体から得た全血の試料中で検出することが好ましい。

30

【0192】

本開示の代替的な実施形態では、個体における間質性肺疾患を経時的に監視して、疾患が進行しているか否かを決定するための方法を提供する。この実施形態の実践に使用する特定の技法は、上記の実施形態で使用する技法と同様である。本方法は、対象からの血清または肺組織などの生体試料をある特定の時点（ t_1 ）で得ること、生体試料中のバイオマーカーのうちの少なくとも1つのレベルを測定すること、及びその測定したレベルを、より早い時点（ t_0 ）で対象から得た生体試料に関して測定したレベルと比較することによって実施する。測定したレベル間の差異に応じて、マーカーレベルが、間隔（ $t_1 \sim t_0$ ）にかけて、増大したか、減少したか、または一定のままであったかを知ることができる。間質性肺炎を示す方向へのマーカーのさらなる偏差、または追加的な増大した間質性肺疾患マーカーの測定は、間隔の間の疾患の進行を示唆し得る。後続の試料収集及び測定は、様々な時点 $t_2 \sim t_n$ にわたって何度でも所望するだけ実施することができる。

40

【0193】

連続的なマーカーレベル決定を行うことによって個体を監視する能力は、有益な臨床ツールを表し得る。単独の試験によって提供される限定的な「寸評」よりも、このような監視は、経時的なマーカーレベルの動向を明らかにし得る。疾患の進行の示唆に加えて、個体におけるマーカーレベルの追跡を使用して、憎悪を予測するか、または疾患の臨床経過

50

を示し得る。例えば、当業者には明らかとなるように、本開示のバイオマーカーをさらに調査して、間質性肺疾患の既知の型のいずれかもしくは全て、または疾患の後述するいずれの型または亜型も区別し得る。加えて、本開示のいずれの方法の感度及び特異性も、間質性肺疾患を他の疾患と区別することに関して、または再発もしくは寛解を予測するために、さらに調査し得る。

【0194】

類似の形で、薬物または混合薬の投与は、本開示のアッセイ結果を踏まえて評価または再評価することができる。例えば、薬物（複数可）は異なる対象集団に異なって投与することができ、投与に対応する測定を分析して、薬物投与前後の本発明のバイオマーカーのシグニチャーにおける差異が有意であるかどうかを決定することができる。異なる薬物連
10
隊からの結果も、直接相互に比較することができる。あるいは、アッセイ結果は、ある投薬計画が別のものよりも望ましいことを示し得るか、または特定の投薬計画を間質性肺炎の個体に施すべきかそうでないかを示し得る。1つの実施形態では、間質性肺疾患の個体における本開示のマーカー遺伝子の上昇したレベルの発見は、不良な予後を示す。別の実施形態では、間質性肺疾患の個体における本開示のマーカー遺伝子の上昇したレベルの不在は、良好な予後を示す。

【0195】

別の態様では、本開示は、間質性肺疾患の治療における治療用化合物としての使用に対して候補化合物をスクリーニングする方法を提供する。1つの実施形態では、本方法は、肺試料が本開示のバイオマーカーの上昇したレベルを有することを示した間質性肺疾患の
20
患者に投与した後に臨床的進行を提供する化合物に対して候補化合物をスクリーニングすることを含む。

【0196】

類似の形で、本開示のバイオマーカーを使用して、対象における治療的介入の効果を評定することができる。第2の測定の前（すなわち、 t_0 後及び t_1 前）に、好適な治療を開始し得るか、または現行の治療を変更し得ることを除外して、上記のものと同一の手法を使用し得る。治療は、薬物投与、食事制限、または外科手術などの任意の治療的介入であることができ、介入に応じて適切に、任意の期間にかけての任意の好適なスケジュールに従うことができる。その後、前後の測定を比較して、治療が効果を有したか否かを決定し得る。当業者には理解されるだろう通り、決定は、他の多重過程（例えば、同期間中の
30
疾患の憎悪）によって混同され得る。

【0197】

さらなる実施形態では、マーカーを使用して、候補薬物が間質性肺疾患の治療に有効であるか否かを決定するために、例えば臨床試験において、候補薬物をスクリーニングし得る。 t_0 時点で、間質性肺炎と診断された対象の集団における各対象から生体試料を得る。次に、各対象の試料にアッセイを実施して、生物学的マーカーのレベルを測定する。一部の実施形態では1つのマーカーのみを監視するが、他の実施形態では、最大で本明細書で提供する全マーカー数の組み合わせを監視する。次に、事前決定した用量の候補薬物を、同一の対象集団の一部分または亜集団に投与する。薬物投与は、任意の期間にかけての任意の好適なスケジュールに従うことができる。一部の場合には、変動する用量を亜集団
40
内の異なる対象に投与するか、または薬物を異なる経路で投与する。薬物投与後の t_1 時点で、亜集団から生体試料を収集し、測定値を得るために以前に実施したものと同一のアッセイをその生体試料に実施する。前述同様、後続の試料収集及び測定は、様々な時点 $t_2 \sim t_n$ にわたって何度でも所望するだけ実施することができる。このような研究では、対象集団の異なる亜集団は、偽薬を投与する対照群として働く。その後、生体試料の採取、試料の処理、及び測定図を得るための生物学的マーカーの測定という同一の手順に従う。

【0198】

特定の用量及び送達経路を検証することもできる。本方法は、候補薬物を指定の用量及び送達経路で間質性肺疾患を持つ対象に投与すること、対象からの血清または組織などの
50

生体試料を得ること、生体試料の各々におけるバイオマーカーのうちの少なくとも1つのレベルを測定すること、ならびに各試料について測定したレベルを他の試料及び/または標準レベルと比較することによって実施する。典型的には、標準レベルは、薬物投与前の対象における同一のマーカーまたは複数のマーカーを測定することによって得る。測定レベルと標準レベルとの間の差異に応じて、薬物が間質性肺疾患に効果を有すると見なすことができる。複数のバイオマーカーを測定する場合、薬物を有効であると見なすためには、少なくとも1つ及び最大で全てのバイオマーカーが期待した方向に変化する必要がある。薬物を有効であると見なすためには、複数のマーカーが変化することが好ましく、このような変化は統計的に有意であることが好ましい。

【0199】

10

当業者には明らかとなるように、上の説明は候補薬物に限定されず、いずれかの治療的介入が間質性肺疾患の治療に有効であるか否かの決定に適用可能である。

【0200】

典型的な実施形態では、間質性肺疾患に罹患している対象集団を研究のために選択する。集団は、典型的に、臨床試験の対象を選択するための標準的なプロトコルを使用して選択する。例えば、対象は概して、健康であり、他の薬剤を服用しておらず、かつ年齢及び性別において均等に分布する。対象集団はまた、複数の群、例えば、候補薬物が対処する異なる型または異なる程度の障害を患い得る亜集団に分けることができる。個体集団の層別化は、本開示のバイオマーカーのレベルに基づいて行い得る。

【0201】

20

概して、ある数の統計的考察を試験の設計において行い、バイオマーカー測定の統計的に有意な変化を薬物投与後に検出できることを確実にする必要がある。バイオマーカーの変化量は、薬物の強度、薬物の用量、及び治療スケジュールを含む、ある数の因子に依存する。適切な対象集団サイズを決定する方法は、統計学の当業者には明らかとなるだろう。研究は、比較的小さい効果のサイズを検出するように設計することが好ましい。

【0202】

対象を、任意に、一切の以前の薬物使用から、好適な期間「洗い出し」てもよい。洗い出しは、正確な基準値測定をすることができるよう、一切の以前の薬剤の効果を除去する。 t_0 時点で、生体試料を集団における各対象から得る。次に、各対象の試料にアッセイまたは種々のアッセイを実施して、特定の本開示のバイオマーカーのレベルを測定する。アッセイは、上記のように、従来的方法及び試薬を使用することができる。試料が血液の場合には、典型的には、血清または血漿のいずれかにアッセイを実施する。他の液体または組織については、アッセイを実施する前にさらなる試料調製ステップを必要に応じて含める。アッセイは、本明細書に記載の生物学的マーカーのうちの少なくとも1つの値を測定する。一部の実施形態では1つのマーカーのみを監視するが、他の実施形態では、最大で全マーカーの因子の組み合わせを監視する。マーカーはまた、間質性肺疾患と関連付けられる他の測定及び因子（例えば、MRI撮像）と併せて監視することができる。値を測定する生物学的マーカーの数は、例えば、アッセイ試薬、生体液、及び他の資源の可用性に依存する。

30

【0203】

40

次に、事前決定した用量の候補薬物を、同一の対象集団の一部分または亜集団に投与する。薬物投与は、任意の期間にかけての任意の好適なスケジュールに従うことができ、亜集団は、集団における一部のまたは全ての対象を含むことができる。一部の場合には、変動する用量を亜集団内の異なる対象に投与するか、または薬物を異なる経路で投与する。好適な用量及び投与経路は、薬物の特定の特徴に依存する。薬物投与後の t_1 時点で、別の生体試料（「 t_1 試料」）を亜集団から収集する。典型的には、試料は、薬物投与前の対象集団から収集した試料（「 t_0 試料」）と同一の型の試料であり、同一の形で処理する。 t_0 試料に対するものと同じのアッセイを t_1 試料に実施して、測定値を得る。後続の試料収集及び測定は、様々な時点 $t_2 \sim t_n$ にわたって何度でも所望するだけ実施することができる。

50

【0204】

典型的には、対象集団の異なる亜集団を、偽薬を投与する対照群として使用する。その後、生体試料の採取、試料の処理、及び測定値を得るための生物学的マーカーの測定という同一の手順に従う。加えて、異なる薬物を任意の数の異なる亜集団に投与して、複数の薬物の効果を比較することができる。当業者には明らかとなるように、上の説明は、臨床試験を伴う方法の非常に単純化した説明である。臨床試験はさらに多くの手順要件を有し、本方法は、全てのこのような要件に従って、典型的には実践されることを理解されたい。

【0205】

現在では、種々のバイオマーカーの対応のある測定が各対象に対して利用可能である。異なる測定値を比較及び分析して、候補薬物が疾患の治療に有効であることを示す、生物学的マーカーが薬物群について期待した方向に変化したか偽薬群についてはしなかったか否かを決定する。一部の実施形態では、このような変化は統計的に有意である。候補薬物を受けた群についての t_1 時点での測定値を、標準測定値、好ましくは、その群に薬物を与える前、すなわち、 t_0 時点での測定値と比較する。典型的には、比較は、薬物または偽薬投与の前後の集団全体の測定値の統計的分析という形態をとる。任意の従来の統計的方法を使用して、生物学的マーカー値の変化が統計的に有意であるか否かを決定することができる。例えば、データの分布に応じて、対応のあるパラメトリック t 検定か、ノンパラメトリック符号または符号順位検定のいずれかを使用して、対応のある比較を各バイオマーカーについて行うことができる。

【0206】

加えて、検定を行って、薬物群中で見出された統計的に有意な変化が併せて偽薬群中で見出されないことを確実にし得る。このような試験なしでは、観察された変化が全ての個体中で起こり、そのため候補薬物投与の結果ではないのか否かを決定することはできない。

【0207】

遺伝子マーカー発現値は、間質性肺疾患に罹患している個体から得た試料中でより高い。遺伝子発現マーカーのうちの1つ以上の測定値における有意な減少は、薬物が有効であることを示す。1つのバイオマーカーのみを測定する場合には、薬物効能を示すためにはその値が減少する必要がある。2つ以上のバイオマーカーを測定する場合には、薬物効能は、1つのバイオマーカーのみ、全てのバイオマーカー、またはその間の任意の数における変化によって示され得る。一部の実施形態では、複数のマーカーを測定し、薬物効能は、複数のマーカーにおける変化によって示される。測定は、本開示のバイオマーカーと、間質性肺疾患と関連付けられる他の測定及び因子との両方の測定であることができる。さらに、遺伝子バイオマーカーレベルの減少量は、薬物の相対的効能の兆候となり得る。

【0208】

間質性肺疾患の治療に有効であるか否かの決定に加えて、本開示のバイオマーカーを使用して、候補薬物の用量効果を検証することもできる。変動する用量を検証し得るある数の異なる方法がある。例えば、異なる用量の薬物を異なる対象集団に投与することができ、各用量に対応する測定を分析して、薬物投与前後の本発明のバイオマーカーにおける差異が有意であるかどうかを決定することができる。この方法により、変化をもたらすために必要な最小の用量を推定することができる。加えて、異なる用量からの結果を相互に比較して、各バイオマーカーが用量の関数としてどのような挙動をするのかを決定することができる。薬物スクリーニングの結果に基づいて、本開示のマーカーは、治療診断剤 (theragnostics) として使用することができる、つまり、それらは、医学的治療を個別化するために使用することができる。

【0209】

キット

別の態様では、本開示は、本開示のポリヌクレオチドまたはポリペプチドマーカー (複数可) を検出するためのキットを提供する。キットは、アッセイ試薬、アッセイ対照、ブ

10

20

30

40

50

ロトコル、例示的アッセイ結果、または本開示のマーカー（複数可）の発現レベルを評価するための手段を使用者に提供するように設計されたこれらの要素の組み合わせを含む、アッセイシステムとして準備してもよい。

【0210】

別の態様では、本開示は、対象からの生体試料における少なくとも1つのポリペプチドまたはポリヌクレオチドマーカーを検出するための試薬を含む、個体における間質性肺疾患を診断するためのキットを提供する。

【0211】

本開示のキットは、ポリペプチドマーカーと特異的に結合する抗体、抗体との標識した結合パートナー、抗体またはその結合パートナーが固定化される固相、ポリヌクレオチドマーカーにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドプローブ、適切な反応条件下でポリヌクレオチドマーカーまたはポリヌクレオチドをコードするポリペプチドマーカーの少なくとも一部分の増幅を刺激することができる（例えば、PCRによって）プライマーの対、キットの使い方についての説明書、及び診断上または治療上の使用に対する規制当局の承認を示すラベルまたは挿入物のうちの1つ以上を備えてもよい。

【0212】

本開示は、本開示のポリペプチド、本開示のポリヌクレオチド、または本開示のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドと特異的に結合する抗体などの分子を含む、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドマイクロアレイをさらに含む。本開示のこの態様では、マイクロアレイ技術の標準技法を利用して、ポリペプチドバイオマーカーの発現を評定、及び/またはこのようなポリペプチドと結合する生体構成要素を特定する。タンパク質マイクロアレイ技術は、当業者に周知であり、固定基質上の特定したペプチドまたはタンパク質のアレイを得ること、標的の分子または生体構成要素をペプチドと結合させること、及びこのような結合を評価することに基づくが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドアレイ、特に本開示のポリペプチドと結合するアレイはまた、ポリペプチドバイオマーカーの発現を特徴とする状態、例えば、間質性肺疾患を有する対象を特定するためなどの診断的用途に使用することができる。

【0213】

本開示のアッセイシステムは、マーカー遺伝子（複数可）の増幅のレベル、及び/またはマーカー遺伝子（複数可）の多染色体性のレベルを肺細胞の試料中で検出するための手段を含むことができる。アッセイシステムはまた、1つ以上の対照も含むことが好ましい。対照は、(i) 個体において間質性肺疾患を検出するための対照試料、(ii) 間質性肺疾患の不在を検出するための対照試料、及び(iii) 間質性肺疾患の診断または進行に関して測定する遺伝子マーカーの事前決定された対照レベルを含む情報を含み得る。

【0214】

別の実施形態では、本開示のマーカー（複数可）の発現レベルを検出するための手段は、概して、抗体及びその抗原結合断片、ペプチド、結合パートナー、アプタマー、酵素、ならびに小分子を含むことができるがこれらに限定されない、いかなる型の試薬でもあることができる。免疫組織化学または別の結合アッセイを実施するための試薬など、このような検出手段を使用するアッセイを実施するのに有用なさらなる試薬も含まれ得る。

【0215】

本開示のアッセイシステムの検出のための手段は、検出可能なタグまたは検出可能な標識と複合体化することができる。このようなタグは、目的とする遺伝子またはタンパク質を検出するために使用する試薬の検出を可能にする任意の好適なタグであることができ、分光法によって検出可能な任意の組成物または標識を含むが、これらに限定されない。本開示で有用な標識としては、標識したストレプトアビジン複合体を用いた染色のためのビオチン、磁気ビーズ（例えば、Dynabeads（商標））、蛍光染料（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など）、放射性標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P ）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びELISAで一般に使用される他のもの

）、及びコロイド金または着色ガラスもしくはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズなどの比色標識が挙げられる。

【0216】

加えて、本開示のアッセイシステムの検出のための手段は、基質上に固定化することができる。このような基質としては、前述の検出方法のうちのいずれかで使用し得るものなどの、検出試薬の固定化のための任意の好適な基質が挙げられる。端的には、検出のための手段の固定化に好適な基質としては、所望の標的分子を検出する検出手段の活性及び／または能力に有意に影響することなく検出のための手段と結合を形成することができる、任意の固体有機、バイオポリマー、または無機支持体などの任意の固体支持体が挙げられる。例示的な有機固体支持体としては、ポリスチレン、ナイロン、フェノールホルムアルデヒド樹脂、及びアクリル共重合体（例えば、ポリアクリルアミド）などのポリマーが挙げられる。本キットはまた、試薬の検出のため、及び／または陽性もしくは陰性対照、洗浄溶液、希釈緩衝液などの標識のために好適な試薬も含むことができる。アッセイシステムはまた、システムの使用及び結果の解釈のための書面の説明書一式も含むことができる。

10

【0217】

アッセイシステムはまた、概して試料中の既知のマーカーの存在（核酸またはタンパク質レベルで）を検出する方法において使用することができるいかなる型の試薬でもあり得る、試料抽出する細胞型に特有の対照マーカーを検出するための手段を含むこともできる。具体的には、本手段は、それが、細胞型を確実に特定する、分析する細胞型の特異的なマーカーを特定するという点において、特徴付けられる。例えば、間質性肺疾患のアッセイでは、バイオマーカー発現及び／または生物学的活性のレベルについて肺細胞をスクリーニングすることが望ましい。したがって、対照マーカーを検出するための手段は、肺細胞に特有のマーカーを特定することで、その細胞が他の細胞型と区別されるようにする。このような手段は、本開示のアッセイの精度及び特異性を高める。対照マーカーを検出するためのこのような手段としては、タンパク質マーカーをコードする核酸分子にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするプローブ、このような核酸分子を増幅するPCRプライマー、標的分子上の配座的に異なる部位と特異的に結合するアプタマー、及び／または抗体、その抗原結合断片、もしくは試料中の対照マーカーと選択的に結合する抗原結合ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。多くの細胞マーカーのための核酸及びアミノ酸配列が、当該技術分野で既知であり、このような検出用試薬を産生するために使用できる。

20

30

【0218】

一部の実施形態では、本キットは、選択する検出方法に応じて、例えば上記のように、プライマー、または遺伝的変異体を検出することができる少なくとも1つのプローブを含む（または本質的にそれらから成る）。一部の実施形態では、本キットは、プライマー、または5 p 1 5、6 p 2 4、7 q 2 2、1 1 p 1 5、1 5 q 1 4 - 1 5、1 7 q 2 1、1 9 p 1 3、及び8 p 2 3から成る群から選択される領域における遺伝的変異体を検出することができる少なくとも1つのプローブを含む。一部の実施形態では、本キットは、プライマー、または6 p 2 4における少なくとも1つの遺伝的変異体（例えば、r s 2 0 7 6 2 9 5またはr s 3 7 7 8 3 3 7）を検出することができる少なくとも1つのプローブを含む。一部の実施形態では、本キットは、プライマー、または7 q 2 2における少なくとも1つの遺伝的変異体（例えば、r s 4 7 2 7 4 4 3）を検出することができる少なくとも1つのプローブを含む。一部の実施形態では、本キットは、プライマー、または1 1 p 1 5における少なくとも1つの遺伝的変異体（例えば、r s 8 6 8 9 0 3、r s 7 9 3 4 6 0 6、r s 6 4 2 1 9 7 2、r s 7 4 8 0 5 6 3、r s 7 9 4 2 8 5 0、r s 4 0 7 7 7 5 9、r s 2 3 3 4 6 5 9、r s 2 3 3 4 6 5 9、r s 7 1 2 2 9 3 6）を検出することができる少なくとも1つのプローブを含む。一部の実施形態では、本キットは、プライマー、または5 p 1 5における少なくとも1つの遺伝的変異体（例えば、r s 2 7 3 6 1 0 0）を検出することができる少なくとも1つのプローブを含む。一部の実施形態では、

40

50

本キットは、プライマー、または15q14-15における少なくとも1つの遺伝的変異体（例えば、rs2034650、rs1992272）を検出することができる少なくとも1つのプローブを含む。一部の実施形態では、本キットは、プライマー、または17q21における少なくとも1つの遺伝的変異体（例えば、rs1981997、rs17563986、rs8070723）を検出することができる少なくとも1つのプローブを含む。一部の実施形態では、本キットは、プライマー、または19p13における少なくとも1つの遺伝的変異体（例えば、rs12610495、rs2109069）を検出することができる少なくとも1つのプローブを含む。一部の実施形態では、本キットは、プライマー、または8p23における少なくとも1つの遺伝的変異体（例えば、rs1379326）を検出することができる少なくとも1つのプローブを含む。一部の実施形態では、本キットは、プライマー、または任意の組み合わせでの5p15、6p24、7q22、11p15、15q14-15、17q21、19p13、及び8p23における2つ以上（例えば、2、3、4、5、5～10、10～20個以上）の遺伝的変異体を検出することができるプローブを含む。

10

【0219】

一部の実施形態では、プライマー及び/またはプローブは、例えば蛍光標識またはFRET標識によって標識される。一部の実施形態では、プライマー及び/またはプローブは非標識である。一部の実施形態では、キットは、例えば異なる標識によって、選択される遺伝的変異体部位で変異型対立遺伝子配列と優性対立遺伝子配列との両方を検出するか、または増幅もしくは異なる質量のプライマー伸長産物を生成するように設計された、プライマー及び/またはプローブを含む。

20

【0220】

一部の実施形態では、本キットは、少なくとも1つの対照試料、例えば、選択される遺伝的変異部位（複数可）で優性対立遺伝子（複数可）を持つ試料（複数可）、または選択される遺伝的変異部位（複数可）で変異型対立遺伝子（複数可）を持つ試料（複数可）をさらに含む。

【0221】

インビトロ複合体

例えば遺伝的変異体配列の存在を示すためにインビトロアッセイにおいて形成させた核酸複合体を、本明細書で提供する。当業者は、例えばホモ接合型対象とヘテロ接合型対象とを区別するためのアッセイにおいて、プローブまたはプライマーの設計に応じて、優性対立遺伝子配列の存在を検出するためにも、核酸複合体を形成させ得ることを理解するだろう。

30

【0222】

一部の実施形態では、複合体は、遺伝的変異体核酸にハイブリダイズする第1の核酸を含み、その遺伝的変異体核酸は、5p15、6p24、7q22、11p15、15q14-15、17q21、19p13、及び8p23から選択される領域における、またはTERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、MUC5B、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、及びWNT3から選択される遺伝子における、遺伝的変異体である。一部の実施形態では、遺伝的変異体核酸は増幅産物である。一部の実施形態では、遺伝的変異体核酸は、例えば、間質性肺疾患に罹患しているか、または罹患が疑われる対象からの、ゲノムDNAである。一部の実施形態では、第1の核酸は、増幅産物またはプライマー伸長産物である。一部の実施形態では、第1の核酸は標識される。一部の実施形態では、核酸複合体は、遺伝的変異体核酸にハイブリダイズした第2の核酸をさらに含む。一部の実施形態では、第2の核酸は、例えばFRETまたは他の蛍光標識で標識される。一部の実施形態では、第1及び第2の核酸は、遺伝的変異体配列にハイブリダイズするときに、FRET対を形成する。

40

【0223】

50

一部の実施形態では、核酸複合体は、DNAポリメラーゼ（例えば、標準的DNAポリメラーゼ、またはTaqなどの熱安定性ポリメラーゼ）またはリガーゼなどの酵素をさらに含む。

【0224】

本開示は以下の実施形態を含むが、これらに限定されない。

【0225】

1. 個体が、間質性肺疾患を発病及び/または急速に進行させることが予測されるかどうかを決定するための方法であって、個体からの生体試料において、

a) rs2736100、rs2076295、rs3778337、rs4727443、rs868903、rs7934606、rs6421972、rs7480563、rs7942850、rs4077759、rs2334659、rs7122936、rs2034650、rs1992272、rs1981997、rs17563986、rs8070723、rs12610495、rs2109069、rs1379326、rs1881984、rs10936599、rs1997392、rs6793295、rs2609255、rs2853676、rs10484326、rs10748858、rs2067832、rs11191865、rs2301160、rs3829223、rs2857476、rs1278769、rs1007177、rs10518693、rs393152、rs12373139、rs17690703、rs2532274、rs2532269、rs2668692、rs169201、rs199533、及びrs415430から成る群から選択されるマーカー多型の存在、

10

20

b) MUC5B、TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、またはそれらの相同体もしくは変異体から成る群から選択される少なくとも1つの配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子から成る群から選択されるマーカー遺伝子または複数のマーカー遺伝子の遺伝子発現のレベル、

c) b)のマーカー遺伝子によってコードされるポリペプチド、

d) c)のポリペプチドの断片、ならびに

30

e) b)のマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチド、

のうちの少なくとも1つを検出することを含み、複数のマーカーの存在が、個体が間質性肺炎を発病するか、または進行性のIIP疾患を発病するかを示す、方法。

【0226】

2. 検出される遺伝子が、b)の対応するマーカー遺伝子と100%の配列同一性を共有する、実施形態1に記載の方法。

【0227】

3. 複数のマーカーのうちの少なくとも1つの存在またはレベルが決定され、標準レベルまたは参照集合と比較される、実施形態1に記載の方法。

40

【0228】

4. 標準レベルまたは参照集合が、危険予測のための統計的手順に従って決定される、実施形態1に記載の方法。

【0229】

5. 危険予測のための統計的手順が、比例ハザード係数によって加重したマーカー（複数可）の遺伝子発現の合計、またはマーカーの集合の存否を使用することを含む、実施形態4に記載の方法。

【0230】

6. 少なくとも1つのマーカーの存在が、ポリペプチドの存否または発現レベルを検出することによって決定される、実施形態1に記載の方法。

50

【 0 2 3 1 】

7. 方法が、ポリペプチドまたはその断片に特異的に結合する試薬を使用してポリペプチドの存在を検出することをさらに含む、実施形態 6 に記載の方法。

【 0 2 3 2 】

8. 試薬が、抗体、抗体誘導体、及び抗体断片から成る群から選択される、実施形態 7 に記載の方法。

【 0 2 3 3 】

9. マーカーの存在が、遺伝子多型の遺伝子座でゲノム DNA の配列を得ることによって決定される、実施形態 1 に記載の方法。

【 0 2 3 4 】

10. マーカーの存在が、生体試料から RNA を得、その RNA から cDNA を生成し、その cDNA をマーカー遺伝子に対するプローブまたはプライマーで増幅し、増幅された cDNA から試料中の遺伝子または遺伝子発現産物の発現レベルを得ることによって、決定される、実施形態 1 に記載の方法。

【 0 2 3 5 】

11. 個体がヒトである、実施形態 1 のいずれかに記載の方法。

【 0 2 3 6 】

12.

a) 生体試料におけるマーカー遺伝子もしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを間質性肺疾患、IIP を発病する危険性、または進行性間質性肺炎への罹患に相関性があつたマーカー遺伝子の対照レベル、

間質性肺疾患もしくは間質性肺炎の緩徐な進行もしくは無進行、または IIP を発病する低い危険性に相関性があつたマーカーの対照レベル、から成る群から選択されるマーカー遺伝子（複数可）の対照レベルと比較すること、及び

b) 個体の生体試料中のマーカー遺伝子の発現レベルが、間質性肺疾患、または間質性肺炎の急速な進行に相関性があつたマーカー遺伝子の発現の対照レベルと統計的に同様もしくはそれを上回る場合、間質性肺炎の発病を急速に進行させると予測されるものとして個体を選択すること、あるいは

c) 個体の生体試料中のマーカー遺伝子のレベルが、間質性肺疾患、または間質性肺炎の急速な進行に相関性があつたマーカー遺伝子の発現の対照レベルと統計的に同様もしくはそれを上回る場合、間質性肺炎を発病しないか、または緩徐に進行すると予測されるものとして個体を選択すること、をさらに含む、実施形態 1 のいずれかに記載の方法。

【 0 2 3 7 】

13.

生体試料において、多型の存在を、発病された間質性肺炎を有する個体または対照群からの遺伝的変異体または多型マーカーの集合と比較すること、及び

生体試料中に存在する多型マーカーが、個体もしくは対照群からの多型マーカーの集合と同じであるか、または統計的に同様である場合、間質性肺炎を発病するか、またはそれを進行させることが予測されるものとして、個体を選択すること、あるいは

生体試料中に存在する多型マーカーが、個体もしくは対照群からの遺伝的変異体もしくは多型マーカーの集合と同じであるか、または統計的に同様である場合、間質性肺炎を発病するか、または急速に進行させることが予測されるものとして、個体を選択すること、をさらに含む、実施形態 1 に記載の方法。

【 0 2 3 8 】

14. 対象における間質性肺疾患または間質性肺炎の進行を監視するための方法であつて、

i) 対象から得た第 1 の生体試料における複数の遺伝子マーカーの発現レベルを測定することであつて、複数のマーカーが、MUC5B、TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100

10

20

30

40

50

128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、またはそれらの相同体もしくは変異体から成る群から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子、

b) a)のマーカー遺伝子によってコードされるポリペプチド、

c) d)のポリペプチドの断片、ならびに

e) b)のマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチド、から成る群から選択される複数のマーカーを含む、対象から得た第1の生体試料における複数の遺伝子マーカーの発現レベルを測定すること、

ii) 対象から得られる第2の生体試料における複数のマーカーの発現レベルを測定することと、

iii) 第1の試料において測定されるマーカーの発現レベルを第2の試料において測定されるマーカーのレベルと比較することと、を含む、方法。

【0239】

15. 検出されるマーカー遺伝子が、a)の対応するマーカー遺伝子と100%の配列同一性を共有する、実施形態14に記載の方法。

【0240】

16. 胸部のCTスキャン及び対象からの肺組織の病理検査から成る群から選択される経過観察ステップを実施することをさらに含む、実施形態14に記載の方法。

【0241】

17. 対象からの第1の生体試料が、 t_0 時点で得られ、対象からの第2の生体試料が、後の t_1 時点で得られる、実施形態14に記載の方法。

【0242】

18. 第1の生体試料及び第2の生体試料が、様々な時点にわたって2回以上対象から得られる、実施形態14に記載の方法。

【0243】

19. ヒト対象における間質性肺疾患または間質性肺炎の治療の効果を評価する方法であって、

i) t_0 時点で対象から得られる第1の試料中で測定されるマーカーの発現レベルであって、マーカーが、

a) TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、またはそれらの相同体もしくは変異体から成る群から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子、

b) a)のマーカー遺伝子によってコードされるポリペプチド、

c) b)のポリペプチドの断片、及び

d) a)のマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチド、から成る群から選択される、発現レベル、

ii) t_1 時点で対象から得られる第2の試料中のマーカーのレベル、を比較すること、ならびに

iii) 胸部のCTスキャン及び対象からの肺組織の病理検査から選択される経過観察ステップを実施すること、を含み、

第1の試料と比べた第2の試料中のマーカーのレベルの減少が、治療が対象における間質性肺炎の治療に効果的であることの兆候である、方法。

【0244】

20. 検出される遺伝子が、a)の対応するマーカー遺伝子と100%の配列同一性を共有する、実施形態19に記載の方法。

【0245】

21. t_0 時点が、治療が対象に施される前であり、 t_1 時点が、治療が対象に施された後である、実施形態19に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0246】

22. 比較が、様々な時点にわたって繰り返される、実施形態19に記載の方法。

【0247】

23. 間質性肺炎のための個体の予後の療法を予測するためのアッセイシステムであって、

a) rs2736100、rs2076295、rs3778337、rs4727443、rs868903、rs7934606、rs6421972、rs7480563、rs7942850、rs4077759、rs2334659、rs7122936、rs2034650、rs1992272、rs1981997、rs17563986、rs8070723、rs12610495、rs2109069、rs1379326、rs1881984、rs10936599、rs1997392、rs6793295、rs2609255、rs2853676、rs10484326、rs10748858、rs2067832、rs11191865、rs2301160、rs3829223、rs2857476、rs1278769、rs1007177、rs10518693、rs393152、rs12373139、rs17690703、rs2532274、rs2532269、rs2668692、rs169201、rs199533、及びrs415430から成る群から選択されるマーカー多型の存在、

b) TERT、DSP、MUC2、DISP2、MAPT、DPP9、CSMD1、MYNN、LRRC34、FAM13A、OBFC1、TOLLIP、ATP11A、IVD、CRHR1、IMP5、LOC100128977、KIAA1267、NSF、WNT3、C17orf69、またはそれらの相同体もしくは変異体から成る群から選択される配列と少なくとも95%の配列同一性を有するマーカー遺伝子から成る群から選択されるマーカー遺伝子または複数のマーカー遺伝子の遺伝子発現のレベル、

c) b)のマーカー遺伝子によってコードされるポリペプチド、

d) c)のポリペプチドの断片、ならびに

e) b)のマーカー遺伝子の少なくとも一部分に完全に相補的であるポリヌクレオチド、のうちの少なくとも1つを検出するための手段を含む、アッセイシステム。

【0248】

24. 検出するための手段が、マーカー遺伝子多型もしくは遺伝子(複数可)の少なくとも10~50個の隣接する核酸を含む核酸プローブまたはそれらの相補的核酸配列を含む、実施形態23に記載のアッセイシステム。

【0249】

25. 検出するための手段が、マーカー遺伝子でコードされたポリペプチドを特異的に検出する結合リガントを含む、実施形態23に記載のアッセイシステム。

【0250】

26. 検出される遺伝子が、b)の対応するマーカー遺伝子と100%の配列同一性を共有する、実施形態23に記載のアッセイシステム。

【0251】

27. 検出するための手段が、アッセイ表面上に配置される核酸プローブ及び結合リガントのうちの少なくとも1つを含む、実施形態23に記載のアッセイシステム。

【0252】

28. アッセイ表面が、チップ、アレイ、または流動性カードを含む、実施形態27に記載のアッセイシステム。

【0253】

29. プローブが、マーカー遺伝子の少なくとも10~50個の核酸配列に相補的な核酸配列を含む、実施形態28に記載のアッセイシステム。

【0254】

30. 結合リガントが、抗体またはその結合断片を含む、実施形態28に記載のアッセイシステム。

【0255】

10

20

30

40

50

31．事前決定された対照レベルを含有する情報から選択される対照と、間質性肺疾患またはIIP患者における診断、発症、進行、または平均余命と相関性があった遺伝的変異体または多型マーカーの集合と、をさらに含む、実施形態23に記載のアッセイシステム。

【0256】

32．間質性肺炎に罹患しているヒト対象における1つ以上のマーカー遺伝子の遺伝子発現のレベルを検出する方法であって、

間質性肺炎に罹患しているヒト個体から生体試料を得ることと、

個体からの生体試料からの1つ以上の細胞における、TERT、MUC2、TOLLIP、MUC5B、DPP9、DSP、及びそれらの相同体または変異体から選択される遺伝子の発現のレベルを検出すること、を含む、方法。

10

【0257】

33．個体からの生体試料からの1つ以上の細胞における、TERT、MUC2、TOLLIP、MUC5B、DPP9、DSP、及びそれらの相同体または変異体から選択される遺伝子の発現のレベルを検出することをさらに含む、実施形態32に記載の方法。

【0258】

34．個体からの生体試料からの1つ以上の細胞における、MUC5B、TERC、SFTPC、SFTPA2、及びそれらの相同体または変異体から選択される遺伝子の発現のレベルを検出することをさらに含む、実施形態32に記載の方法。

【0259】

20

35．間質性肺炎の治療を必要とする対象にそれを行う方法であって、

ヒト対象から得た生体試料における、TERT、MUC2、TOLLIP、MUC5B、DPP9、DSP、またはそれらの相同体もしくは変異体から選択される1つ以上のマーカー遺伝子のレベルを検出すること、及び

有効量の間質性肺炎治療を施すこと、を含む、方法。

【0260】

36．個体からの生体試料からの1つ以上の細胞における、TERT、MUC2、TOLLIP、MUC5B、DPP9、DSP、及びそれらの相同体または変異体から選択される遺伝子の発現のレベルを検出することをさらに含む、実施形態35に記載の方法。

【0261】

30

37．個体からの生体試料からの1つ以上の細胞における、MUC5B、TERC、SFTPC、SFTPA2、及びそれらの相同体または変異体から選択される遺伝子の発現のレベルを検出することをさらに含む、実施形態35に記載の方法。

【0262】

続く実施例は、本開示の特定の実施形態、及びそれらの種々の使用を例解する。これらは、説明目的のみで示され、本開示を限定するものとして見なされるべきではない。

【実施例】

【0263】

全ての型の線維性IIPを含むIIP個体の症例対照ゲノムワイド関連研究(GWAS、1616症例及び4683対照)及び複製研究(876症例及び1890対照)を本明細書で提供する。a)IIP診断間の区別は、相当な臨床的、病理的、及び放射線学的重複に起因して、多くの場合に問題となるため、及びb)共有の遺伝的感受性についての有力な証拠がある(例えば、FIPを患う家族の40%超が、罹患家系員の間で2つ以上のIIPに罹患している)ため、異なる型のIIPを本研究に含めた。散発性IIPがこの疾患の家族性形態と遺伝子的に同様であるという証拠を、MUC5B、TERT、TERC、及びSFTPC変異体が提供することから、家族性及び散発性IIP個体試料の両方をこのGWAS研究に含めた。

40

【0264】

発明者らIIPの理解を総合的に前進させる遺伝的危険因子を特定することを目的に、本発明者らは、IIPの症例対照ゲノムワイド関連研究(GWAS、1616症例及び4

50

683対照)及び複製研究(876症例及び1890対照)を完了した。全ての型の線維性IIPを症例群に含めた。発明者らは、家族性及び散発性IIPの両方も含めた。

【0265】

研究集団

症例定義米国胸部学会/欧州呼吸器学会によって制定された標準的な基準を使用して、発見及び複製段階における全ての患者の診断分類を決定した。感染症、全身性障害、または関連性のある曝露(例えば、アスベスト)を含む、線維性IIPの発病の原因が分かっている症例は除外した。検出力を最大化し、血統による交絡の可能性を最小限にするため、非ヒスパニック系白人(NHW)患者のみをGWAS及び複製に含めた。全ての対象には、彼らの採用についてのIRBに承認されたプロトコルの一環として、書面のインフォームドコンセントを付与し、GWAS研究は、National Jewish Health IRB及びColorado Combined Institutional Review Board(COMIRB)によって承認された。

【0266】

GWAS発見7コホートからのIIPを患う1914患者を遺伝子型決定し(家族性間質性肺炎[n=566]、National Jewish Health IIP集団[n=238]、InterMune IPF試験[n=720]、UCSF[n=66]、Vanderbilt University IIP集団[n=105]、及びNational Heart Lung and Blood Institute Lung Tissue Research Consortium[n=219])、それらを4683の研究外対照からの遺伝子型と比較した。遺伝子型品質管理後、1616症例を分析に含めた。

【0267】

家族性間質性肺炎(FIP)を患う家族を、3等親内で遺伝子的に関係した個体における確定または推定IIPの少なくとも2症例の存在によって定義した。3つの主要な紹介センター(Vanderbilt University、Duke University、及びNational Jewish Health)を拠点とした家族の採用は、1999年から進行している。第一度近親者で1つのIIP症例のみを含めた。National Jewish HealthのIIPコホートは、臨床ケアと関連付けられる進行中の研究プロトコルの一環としてNational Jewish Healthで臨床的に評価され、登録された、散発性IIPを患う患者から成る。InterMune IPF - Interferon Intervention Trialからの症例のための採用基準の詳細は、詳細に説明されている。端的には、適格患者は、IPFを患い、少なくとも3ヶ月間の臨床症状及び直近12ヶ月間の疾患進行の証拠を持つ40~79歳であった。治療割付に関わらず、全ての利用可能な症例を含めた。National Heart Lung and Blood Institute Lung Tissue Research Consortium(NHLBI LTRC)は、研究団体に肺組織及びDNAを提供するために設立された。IIPと診断されたこれらの対象からのDNAを含めた。

【0268】

他の研究の一環としてCentre d'Etude du Polymorphisme Humain(CEPH)で生成された非特定化対照遺伝子型を使用した。資質のある対照は、NHWであり、発明者ら症例と同一のプラットフォーム上で遺伝子型決定されており、かつ他の研究における対照としての使用が適切に承認されているものであった。発明者ら遺伝子型決定品質管理閾値を通過した症例との遺伝的類似性に基づき、1症例に対しておよそ3対照に対応して、対照の部分集合を選択した(以下の統計的分析を参照されたい)。

【0269】

複製。GWASからの上位SNPの複製のために、総計1027のNHW IIP症例及び2138のNHW対照を遺伝子型決定した。複製対照は、Chronic Obst

r u c t i v e P u l m o n a r y D i s e a s e (C O P D) G e n e S t u d yからの対照の個々の複製群 ($n = 138$) 及び部分集合 ($n = 2000$) からであった。対照を選択して、年齢及び性別に基づいて複製症例と頻度を一致させた。品質管理後、876症例及び1890対照を分析に含めた。

【0270】

発現。GWASからのLung Tissue Research Consortium and National Jewish Health IIP症例の部分集合 ($n = 100$) 及びNational Jewish Health対照 ($n = 94$) 上の遺伝子発現を測定した。全肺試料を、International Institute for the Advancement of Medicine (Edison, NJ) から得た。適格症例及び対照は、アッセイに利用可能な肺組織生検からの十分なRNAを有した。他のIIP診断ではなくIPFを患う症例の方を優先的に選択した。National Jewish Health対照も、利用可能なゲノムワイドSNPデータを有した。

10

【0271】

DNA調製、貯蔵、及び品質管理

ゲノムDNAを、全血及び生検した肺組織の両方から、それぞれ、Autopure LS (Qiagen) またはQiacube (Qiagen) 自動化プラットフォームのいずれかで、単離した。DNAeasyキットを使用してQiacube上で抽出する前に、線維性肺組織を、まず、Lysing Matrix D管及びFastPrep-24卓上ホモジナイザー (MP Biomedicals) を使用して均質化した。単離後、全てのDNAを、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer上で、濃度及び純度についてアッセイした。DNAが、 $50\text{ ng} / \mu\text{l}$ 未満であるか、 $1.7 \sim 2.0$ 範囲を外れた $A260 / A280$ 比を有した場合は、試料を除外した。

20

【0272】

CNGに提出する前に、全ての試料を、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) を使用して再定量し、 $1 \times \text{TE}$ によって正規化し、個々にバーコードを付けたねじ蓋式管の中に等分した。液体取扱ロボットの容積の限界に起因して、CNGへの提出のための絶対最小量は、 $50\text{ ng} / \mu\text{l}$ で30 μl であった。試料がこの最小量を満たさなかった場合は、代替の抽出を実施するか、または試料を研究から留保した。

30

【0273】

複製試料を受領した後、それらを96ウェルのロボットと互換性のあるプレート中に移し、PicoGreenによって定量し、 $1 \times \text{TE}$ によって正規化した。BMGC提出指針に従って、 400 ng のDNAを、GWAS及び複製コホートの各メンバーについて提出した。バッチ効果による交絡を最小限にする目的で、試料を、Tecan Evo200液体取扱ロボットを使用して、プレート当たり2つの重複と共に、全てのコホートにわたって無作為化した様式で、96ウェルプレートに等分した。

【0274】

ゲノムワイド遺伝子型決定

バーコードを付けたDNA試料を、試料情報と共に標準的な管の中に受け、厳密な品質管理 (QC) に供した。濃度、断片化、及びPCRへの応答を決定した。症例及び対照からの試料を、96ウェルプレート上に無作為に分配した。8個のTecan液体取扱ロボット、6個のIllumina BeadArrayリーダー、及び2個のIllumina iScansを装備した、完全自動化Illumina BeadLabにおいて、完全なLIMS制御下で処理を実行した。遺伝子型決定を、Illumina Human610 quadアレイを使用して実行した。複製遺伝子型決定

40

【0275】

1027の独立した症例及び2000のCOPD遺伝子対照中でP値が 0.0001 未

50

満である198のSNP(統計的分析を参照されたい)を遺伝子型決定した。Illumina 660 Quadビーズチップ上においてではなくMUC5BプロモーターSNP rs35705950も遺伝子型決定して、rs35705950についての染色体11p15複製SNPの調整を可能にした。加えて、研究外の対照に対して利用可能でなかった共変量に対する調整を伴う追跡的な統計的共同試験(GWAS症例と複製症例及び対照との両方からの原遺伝子型を使用)を可能にするために、GWAS症例の部分集合も遺伝子型決定した。検証アッセイの詳細を以下に記載する。遺伝子型決定品質管理の後、876症例及び1890対照を複製分析に、GWAS症例のうちの859件を共同分析に含めた。

【0276】

遺伝子型決定の前に、全ての試料を、リアルタイムQ-PCR定量(「QC1」)及びTaqmanを使用する一重遺伝子型決定(「QC2」)によって品質管理した。QC1またはQC2を満たさなかった試料は、遺伝子型決定を遂行はさせたが、後で分析から除去した。

【0277】

検証遺伝子型決定を、多重化された(Sequenom iPLEX)及び一重の(Taqman)アッセイの組み合わせを用いて達成した。まず、ウェブベース(Assay Designer Suite、ウェブサイトsequenom.comで入手可能)及びデスクトップ(Assay Designer)ソフトウェアツール(Sequenom, San Diego)の組み合わせを使用して、多重化されたSequenom iPLEX遺伝子型決定のためのアッセイ設計を、198個のSNPの投入集合に対して実行した(表3)。198個の投入したSNPのうち、193個を、35、35、35、35、31、及び22個のSNPという複合群(plexities)から成る6つのアッセイの集合へと効率的に割り当てた。Sequenom iPLEX遺伝子型決定は、遺伝子座特異多重PCR増幅、遺伝子座特異単位複製配列からの多重塩基伸長(SBE)、及びマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析を使用してベースコーリングしたSBE産物の多重分解能法に基づく。

【0278】

SequenomアッセイのためのプライマーはIDT(Coralville, Iowa)から購入し、iPLEX手順の全ステップは、製造業者の指示に従って、Sequenom(San Diego, CA)からの試薬及び方法を使用して実行した。反応を384ウェルプレート上で実行し、iPLEX Gold試薬及びSpectroCHIPアレイと共にSequenom MassARRAY Analyzer 4システムを使用して分析した。結果を、市販のソフトウェア(Typer 4, Sequenom)及びデータ管理用カスタムツールの組み合わせを使用して分析した。6つの多重群(multiplexes)における193個のアッセイのうち179個が、使用可能な遺伝子型決定データの生成に成功した。

【0279】

元のSequenom iPLEX設計に含まれることに成功しなかった残りの5個のSNP(rs2736100、rs35705950、rs13225346、rs10822856、rs10139381、rs10751635)、及び初期の研究において発表された第6のSNP(rs35705950)を、市販のTaqmanアッセイ(Life Technologies, San Diego, CA)を使用して遺伝子型決定した。これらのSNPのdbSNP rs番号、ならびに用いられたアッセイの市販製品IDを表3に示す。反応を384ウェルプレート上で実行し、Applied Biosystems ABI 7900HT Sequence Detection System(Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して蛍光を読み取った。

【0280】

遺伝子発現

10

20

30

40

50

Ambion mirVanキット(Life Technologies)を使用して、およそ30mgの瞬間冷凍またはRNA-laterで保存した肺組織から、総RNAを単離した。RNA濃度をNanodrop ND-1000(Thermo Scientific)によって決定し、2100 Bioanalyzer(Agilent)を使用して、RNA完全性を決定した。Superscript III First-Strand Synthesis System(Invitrogen)を使用してcDNA一本鎖変換を実施し、Vii7 Real-Time PCR計器(Life Technologies)上で実行した事前設計されたTaqmanアッセイを使用して発現分析を実施した。(DPP9:Hs00373589、DSP:Hs00189422、及びDSP変異体1アッセイはHs00950584、FAM13A:Hs00208453、IVD:Hs01064832、MUC5B:Hs00861588、MUC2:Hs00149374、OBF1:Hs00998588、WNT3:Hs00902257、WNT9B:Hs00916642、GAPDH:4333764F)。GAPDHを内在性対照として使用して、全アッセイを3重で実行した。さらなる対照として、cDNA変換ステップからのプレート当たり1つの試料を2重で実行した。

【0281】

統計的分析

GWAS発見のための研究外対照の選択EIGENSTRAT3.0ソフトウェアを使用して、血統分析を実行した。参照欧州人のHapMapデータ及び試料を、欧州人、西アフリカ人、及び東アジア人集団の代表として使用して、血統情報主要素を推測し、それを症例及び対照試料に投影させた。推定非欧州人試料に異常値としてフラグを立て、後続の分析から排除した。欧州人に由来する匿名遺伝子型の大規模データベースからの症例と密な遺伝子型の一致を持つ対照を得た。サポートベクターマシン(Rパッケージ「e1071」)を用いたクラスタ化に基づく手法を使用し、続く対応のある一致アルゴリズム(Rパッケージ「optmatch」)の適用によって、症例当たり3つの一致対照を得るように、このデータベースから、対照遺伝子型データの部分集合を選択した。この選択では、ゲノムインフレーション係数(GEMMAソフトウェアを用いて集団構造を調整して評価)は0.99であった。

【0282】

第一度近親者の除去。0.45以上の推定親縁係数に基づいて、第一度近親者中で1つの個体のみを含めた。潜在性の近縁性への感度が高いGWASのSNPによって説明される疾患の危険性における百分率変動を見積もるために、0.025より大きい推定親縁係数を持つものの中で1つの個体のみをさらに除去した。

【0283】

発見GWASのための個体の除外及びSNPの優先順位決定。研究所が除外した個体に加えて、1)全対にわたる平均の対IBS推定値からの標準偏差が4より大きかった5番目に近縁の近隣者を用いた対同型性(IBS)による推定値に基づく遺伝的異常値である証拠、2)臨床及びゲノムデータ間の未解決の性別混合一致、3)全個体にわたる平均のヘテロ接合性からの標準偏差が4より大きいか、または4未満である、SNPにわたるヘテロ接合性、

及び4)研究所の品質管理を通過したSNPの98%未満での遺伝子型コールを持つ個体を除外した。この品質管理に基づいて、298症例及び165対照を除外した。研究所の品質管理措置に加えて、他の基準に基づいて追跡のための関連性シグナルを優先順位決定した。症例及び対照間の欠損の割合のカイ二乗試験によって、差異欠損について、及び1-df適合度試験によって、HWEからの逸脱について、試験した。1)0.05より大きいMAF、2)別個に評価した症例及び対照における0.0001より大きいHWE P値、3)2%未満が欠損している場合は0.001より大きい、2%~5%が欠損している場合は0.05より大きい、症例及び対照間の差異欠損に対するP値を持つSNPを優先した。

【0284】

10

20

30

40

50

GWA S 関連性試験。ゲノムワイド効果混合モデル関連性 (genome - wide efficient mixed - model association (GEMMA)) ソフトウェアパッケージで実践される発明者らの症例及び対照中の潜行性の近縁性と集団層別化との両方を説明するために正確な混合モデル手法を使用して、各 SNP と IIP との間の関連性について試験した。発明者らの一次解析のための加法モデル下の関連性について試験し、続いて、試料中の独立性を想定した線形回帰からの加法モデルへの適合の有意な欠如があった場合 ($p < 0.05$)、劣性及び優性モデル p 値の最低値を取った (このような試験は現在 GEMMA ソフトウェア中で実践可能ではない)。全モデルにおいて性別を調整した。加法モデル下で得た p 値の分布を、ゲノムにわたって関連性がないという帰無仮説の下で予測した分布と比較し、分位点 - 分位点 ($Q - Q$ プロット) 及びゲノムインフレーション係数 () を報告して、集団層別化などの実験的または他の交絡因子に起因する系統的バイアスの不在を証明した。複製集団における追跡のために P 値が 0.0001 未満である全 SNP を選択し、 198 個全ての選択した SNP についての遺伝子型スペクトルを目視検査して、遺伝子型コールの品質を確保した。GEMMA における線形モデルはログ - オッズリンク関数よりも識別リンクを使用するため、オッズ比を算出し、ロジスティック回帰モデルからの 95% の信頼区間 (CI) に、症例及び対照中の独立性を想定する性別に対する調整を行った。このように、 CI は、完全混合モデルに基づくものよりもわずかにより狭い場合がある。

【 0285 】

複製関連性。自由に利用可能な SNP GWA ソフトウェア (URL を参照されたい) を使用して、複製症例及び対照における各複製 SNP 及び IIP の間の関連性を試験した。最低の P 値を生み出した GWA S からの遺伝子モデル下 (加法モデル下の 143 個、優性モデル下の 24 個、及び劣性モデル下の 31 個) の関連性について試験した。 20 個のゲノムワイドで有意な GWA S の SNP についての 0.0025 未満の p 値を統計的に有意な複製と見なした。他の 178 個の SNP についての P 値を、GWA S 及び複製コホートのメタ分析中で使用した。

【 0286 】

メタ分析。複製集合における遺伝子型決定に成功した 181 個の SNP の各々と IIP との間の関連性の共同測定を得るために、GWA S 及び複製結果のメタ分析を実行した。加重逆正規法を使用した。 Z_i ($i = \text{GWA S または複製}$) を i 番目の研究における関連性の試験からの試験統計量とし、 v_i ($i = \text{GWA S または複製}$) を対応する重量とした。ここで、GWA S 及び複製からの効果推定値が同一の規模になかったため、重量を i 番目の研究における総試料サイズの平方根とした。この方法は、関連性の方向性を明確に説明することに留意されたい。故に、相反する方向との極めて有意な関連性は、強力な統計的関連性を呈さない。METAL (ウェブサイト sph.umich.edu/csg/abecassis/metal/ で利用可能) を使用して、発明者らのメタ分析を実施した。 P 共同が 5×10^{-8} 未満の SNP をゲノムワイドで統計的に有意であるとみなした。メタ分析においてゲノムワイドで有意であった全ての遺伝子座について、発見 GWA S 結果の遺伝子座特異的プロットを創出した。

【 0287 】

多重 SNP モデル。メタ分析からのゲノムワイドで有意な SNP の効果の独立性を評定するために、組み合わせた症例群 (GWA S 及び複製) 及び複製対照を使用して、各遺伝子座内でロジスティック回帰モデルを使用した。具体的には、ゲノムワイドで有意な SNP を持つ各遺伝子座内で、その遺伝子座内の IIP と他の検証パネル SNP の各々との関連性を試験し、その後、その遺伝子座中で最も有意に関連した SNP に対して調整した (染色体 $11p15$ 上では、 $rs35705950$ に対して調整した)。性別に加えて年齢の効果に対する各 SNP 関連性の安定性を評定するために、IIP と年齢及び性別に対して調整した各 SNP との間の関連性について試験した。

【 0288 】

発現分析。 2 標本 t 検定を使用して、 100 症例及び 94 対照間の肺における差次的遺

10

20

30

40

50

伝子発現について試験した。遺伝子型群中の個体数が5未満でない限り3つの遺伝子型群にわたるANOVAによって、症例群及び対照群の組み合わせを使用して、遺伝子型による差次的発現についても試験し、その症例における希少なホモ接合体及びヘテロ接合体をグループ化した。0.05未満のp値を統計的に有意であると見なした。

【0289】

結果

ゲノムワイド発見

Illumina 660 Quadビーズチップ上で1914の自己申告性、非ヒスパニック系白人線維性IIP症例の遺伝子型を決定した。それらのうち、14、126、8、及び150を、それぞれ、遺伝的異常値であること、別の症例の第一度近親者である証拠、高ヘテロ接合体性、または全てのSNPにわたる遺伝子型の2%を超える欠損に基づいて除外し(統計的方法を参照されたい)、1616症例を分析に含めた。同様にIllumina 660 Quadビーズチップ上で遺伝子型決定された研究対照中15,352において、段階比較別のゲノムワイド同一性に基づいて発明者らの症例に最も遺伝的に類似している4683の対照を使用した。

【0290】

1) 0.05を超えるMAF、2) 別々に評価された症例及び対照中の0.0001を超えるHWE P値、ならびに3) 2%未満の欠損の場合は0.001を超える、及び2%~5%の欠損の場合は0.05を超える、症例と対照との間の差次的欠損(differential missingness)に対するp値を有する439,828個のSNPで、IIPの症例及び対照を比較した。p値のQQプロット(図5)または推定される0.99のゲノムインフレ係数のいずれも、集団の層別化に関するもの等の任意の組織的バイアスを示唆しなかった。各SNPにおけるマイナー対立遺伝子に関する加法モデル下において、ゲノムワイドで有意($P < 5 \times 10^{-8}$)な関連性を有する7個の染色体位置を表す19個のSNPを特定した(図1及び表1)。劣性モデルにおいて、固有の遺伝子座を表す別のゲノムワイドで有意なSNP(rs1379326)を特定した(表1)。

【0291】

複製及びメタ分析

IIPの1027症例及び2138対照の複製コホートにおける遺伝子決定のため、20個のゲノムワイドで有意なSNP、及び $5 \times 10^{-8} < P \text{ 値} < 0.0001$ を有するさらなる178個のSNPを選択した(図1の上線と下線との間のSNP; SNP位置、遺伝子型、及びHWE情報に関しては表3及び4、ならびに198個のSNP全てに関する関連情報は表5を参照されたい)。遺伝子型品質管理の後、181個のSNPでうまく遺伝子型決定された876症例及び1890対照を含めた。20個のゲノムワイドで有意なSNP中13個が、 $P < 0.0025$ で、複製コホート中でIIPに関連付けられ、20の試験に対して保守的なBonferroni補正に対応した(表1、中央列)。GWAS(図2)からの7個の遺伝子座を表す20個のゲノムワイドで有意なSNP中の18個は、メタ分析においてゲノムワイドで有意であった(表1、最終列)。9個の染色体位置(GWAS遺伝子座と重複する5個及び4個のさらなる遺伝子座(図3))を表すさらなる25個のSNPは、メタ分析においてゲノムワイドで有意であった(表1)。

【0292】

GWAS発見中において最も高度に関連付けられたSNP、rs868903(PGWAS = 1.3×10^{-22} ; PMeta = 9.2×10^{-26})は、染色体11p15におけるMUC5B遺伝子のプロモーター中にあり、それがIPF及びFIPに関連付けられることを報告し、他の研究において確認された。MUC2及びTOLLIP遺伝子中のSNPを含む、MUC5B領域中の10個のさらなるSNPもまた、共同分析においてゲノムワイドで有意であり、rs868903の強いLDにおいてはそうではなかった(図2d)。染色体5p15におけるSNP、rs2736100(PMeta = 1.7×10^{-19})及びrs2853676(PMeta = 3.3×10^{-8})は、TERT遺伝

子(図2a)中にあり、rs1881984(PMeta = 4.5×10^{-8})は、TERC遺伝子の近くにある(図3a)。TERT及びTERC中の稀な突然変異は、FIP及びIPFに関連付けられることが報告されており、rs2736100は、TERT遺伝子にあることが以前に報告されている。残る8個のゲノムワイドで有意な遺伝子座は、新しいIIP遺伝子座である(図6)。染色体4q22、6p24、10q24、13q34、及び19p13上の関連シグナルのうちの5つは、単一遺伝子に局在化しているように見える。SNP、rs2609255(PMeta = 2.2×10^{-11})は、染色体4q22におけるFAM13A遺伝子中にある(配列類似性13、メンバーAを有するファミリー)(図3b)。SNP、rs10484326(PMeta = 5.5×10^{-9})及びrs2076295(PMeta = 1.1×10^{-19})は、染色体6p24におけるDSP遺伝子中にある(デスモプラキン)(図2b)。SNP、rs10748858(PMeta = 2.7×10^{-8})、rs2067832(PMeta = 3.7×10^{-8})、及びrs11191865(PMeta = 2.4×10^{-8})は、染色体10q24におけるOBF1遺伝子中にある(オリゴヌクレオチド結合フォールド含有1)(図3c)。SNP、rs1278769(PMeta = 6.7×10^{-9})は、染色体13q34におけるATP11A遺伝子中にある(ATPase、クラスVI、タイプ11A)(図3d)。SNP、rs12610495(PMeta = 1.7×10^{-12})及びrs2109069(PMeta = 2.4×10^{-11})は、染色体19p13においてDPP9遺伝子中にある(ジペプチジル-ペプチダーゼ9)(図2g)。他の3つの染色体領域(7q22、15q14-15、及び17q21)は、任意の遺伝子中で有意なSNPまたは複数の遺伝子中で有意な関連性を有するSNPのいずれも有しなかった(表1及び図2c、2e、2f)。ゲノムワイドで有意なSNPの全てに対して推定されるオッズ比(OR)は、約1.1~約1.6の範囲である(表1; 1未満のMAFに対するORが、同じ範囲におけるメジャー対立遺伝子に対するORに対応する)。

【0293】

ゲノムワイドで有意なSNPに対して調節したモデルの研究

以前に発見されたMUC5BプロモーターSNP(rs35705950; Illumina 660 Quadビーズチップ上ではない)を調整するために、表1のSNPに対する複製症例と同じプラットフォーム上及び同じ時間でGWA S発見症例の部分集合を遺伝子型決定した。共同分析のため、これらの症例(n = 859)からの原遺伝子型と複製症例及び対照を組み合わせた。

【0294】

各領域内の複数の独立した関連シグナルに対する証拠を評価するために、メタ分析に基づいてその領域において最も有意なSNPに調整した後、所与の領域における各SNPとの関連性を試験した。染色体11p15領域に関して、本発明者らの所与の先行結果に対してrs35705950を調整し、関連性の強度を本発明者らの現在の研究集団においてrs35705950とIIPとの間で観察した(OR[95%CI]: 4.51[3.91, 5.21], PJoint = 7.21×10^{-95})。rs35705950に対する調整後、11p15におけるただ1つのSNP(rs4077759)が、わずかにIIPと関連付けられたままであったが(P = 0.03; 表2)、一方、rs35705950は、全てのモデルにおいて極めて有意なままであり、観察された他のSNPとの関連性は、rs35705950との弱いLDによるものであったことを示唆する(SNP間のLDに関しては図6を参照されたい)。上位SNPに対する調整後の他の領域におけるSNPの有意性の低下は、SNP間のLD(表6)と一致し、複数の関連シグナルに対する証拠を提供しない。TERC遺伝子の近くのSNP、rs1881984が、LRRC34遺伝子中のSNP、rs6793295に対する調整後、もはや有意ではないことに留意されたい。

【0295】

最後に、染色体11上のrs7942850を除いて、ゲノムワイドで有意なSNPの全てに対して性別に加えて年齢に対して調整し(P年齢調整 = 0.06)、全てのSNP

は、調整後、有意なままであった（表6）。

【0296】

肺組織中の鍵遺伝子の発現

症例と対照との間の差を試験し、各遺伝子において最も高度に関連付けられたSNPにおける遺伝子型とその遺伝子の発現との間の関連性を試験するために、定量的PCR及び有効なTaqman Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster, City, CA)を使用して、IPFの100症例及び94対照から肺組織中のDPP9、DSP、FAM13A、IVD、MUC5B、MUC2、DISP2、OBFC1、WNT3、及びWNT9Bの発現を測定した。MUC5Bが、対照と比較して症例の肺組織中でより高度に発現されたが ($P = 5.6 \times 10^{-11}$)、IPFの症例中のrs35705950に関する本発明者らの以前の発見と一致するより小さい研究から、rs868903は、MUC5Bの発現と関連付けられなかったという本発明者らの結果を確認した。DSPは、対照と比較して症例中でより高度に発現され ($P = 0.0002$)、発現は、rs2076295における遺伝子型によって異なった ($P = 0.002$)。DSPの相対的発現は、危険対立遺伝子における推定上のコピーの数に伴って増加した（図4）。選択的スプライシングによって生成されるデスモプラキンの2つのアイソフォームが存在する。rs2076295は、標的遺伝子の選択的スプライシングに関与するとされている転写因子PU.1に対する結合部位中に含有されるが、しかしながら、選択的アイソフォームと比較して主要なアイソフォームの発現においてrs2076295遺伝子型の差次的効果に関する証拠は見られなかった。対照と比較して症例中でDPP9のより高い発現に関する名目上の証拠が存在したが ($P = 0.03$)、rs12610495 ($P = 0.46$) またはrs2109069 ($P = 0.72$) のいずれも、DPP9発現に関連付けられなかった。FAM13A、IVD、またはOBFC1のいずれも、症例と対照との間の発現において、または遺伝子型によって異ならなかった（全ての $P > 0.12$ ）。MUC2、DISP2、WNT3、及びWNT9Bは、これらの肺試料中で発現をほとんどまたは全く示さなかった。

【0297】

GWAS SNPによって説明される疾患危険性における変異パーセント

IIIPに対する有病率推定値の範囲（100, 000当たり50～100, 000当たり100）にわたる分散成分モデルを使用して、関連性に関して試験された439, 828個のGWAS SNPの全てによって説明される疾患危険性のパーセントを推定した。GWAS SNPが、IIIPの危険性の推定30%（標準誤差2%）～33%（標準誤差3%）を占めることを発見した。MUC5BプロモーターSNP（rs35705950）を本分析に含めなかったため、これは、一般的なSNPのIIIPの危険性への寄与の控えめな推定値である。

【0298】

考察

これらの発見は、一般的な遺伝的変異が、IIIPなどの間質性肺疾患の危険性の重要な一因であることの説得力ある証拠を提供する。8個の新しい遺伝的に危険な遺伝子座（4q22、6p24、7q22、10q24、13q34、15q14-15、17q21、及び19p13）を特定し、3個の以前に報告された遺伝子/遺伝子座（TERC[3q26]、TERT[5p15]、及びMUC5B[11p15]）における危険な変異体のIIIPにおける役割を確認した。本報告の前は、再現性よくIIIPに関連する一般的な変異体を有するたった2個の遺伝子は、TERT及びMUC5Bであった。まとめると、IIIPに関連付けられる一般的に危険な変異体は、この疾患が、宿主防御、細胞間接着、及び早期細胞老化における欠損によって主に媒介されることを示唆する。その上、これらの発見は、この複雑な疾患における介入試験を導くために使用することができる。

【0299】

小さい末梢気道中で分泌されたムチン（MUC5B）は、IIIPの発病において役割を果たすようである。データは、発明者らがIIIPに対する要の危険因子として以前に特定

したMUC5BプロモーターSNP rs35705950の効果を説明した後、11p15領域における他の遺伝子(MUC2またはTOLLIP)中のSNPの強力な効果を示唆しない。GWAS、複製、及びメタ分析において最も強力に関連するSNPのうちの1つであった、MUC5B遺伝子のプロモーター中のrs868903 SNPは、rs35705950とは強力なLD($r^2 = 0.13$)になく、MUC5Bの転写開始部位の方にrs35705950よりも近い(それぞれ、3 kb対1.5 kb)。IIPを患う患者からの肺組織は、対照よりも高い濃度のMUC5Bを有するが、これらMUC5Bプロモーター変異体のいずれもが、IIPを患う患者におけるMUC5Bの増加した発現の完全な原因ではないように見え、このことは、他の遺伝子変異体または環境毒素がこの疾患に役割を果たすことを示唆する。肺ムチンの調節異常は、1) 改変された粘膜宿主防御、2) 肺胞修復への干渉、3) 肺ムチンの過剰産生によって開始される線維増殖性応答を刺激する直接細胞毒性(小胞体ストレスまたはアポトーシス)という機序のうち1つによって線維増殖を開始または悪化させる可能性がある。

10

【0300】

テロメアの長さを維持する遺伝子は、IIPの発病において役割を果たすようである。本報告以前は、肺線維症とTERT及びTERCとの間の関連性は、TERT及びTERCの希少な変異体、ならびにTERTの一般的な変異体に関与した。これらの遺伝子中の突然変異は、肺胞上皮細胞中の短縮されたテロメアと関連付けられ、このことは、これらの遺伝子変異体が、強化された肺胞上皮のアポトーシスまたは壊死によって肺線維症の危険性を増大させ得ることを示唆する。その上、早期老化に似ており、肺線維症に頻繁に関与する先天性障害である先天性角化異常症は、TERT及びTERCにおける突然変異と関連付けられた。このGWASは、TERT中及びTERC付近、ならびにテロメア長に影響する別の遺伝子であるOBFC1(P メタ = 2.4×10^{-08})中の一般的な変異体を特定した。OBFC1中の一般的な変異体は、一般集団におけるヒト白血球テロメア長の2つのGWAS研究で、テロメア長と関連付けられた。これらの遺伝子と関連付けられる危険性は、希少な変異体に限定されず、一般的に危険な変異を表すように見える。まとめると、これらの発見は、肺線維症の病因におけるテロメア長及び早期の細胞老化の重要性を強調する。

20

【0301】

結果は、IIPを発症する危険性に対する細胞間接着の改変を暗示する。DSP遺伝子中の変異体は、IIP、及びIIPを患う患者の肺組織におけるDSPの発現と強く関連付けられた。DSP遺伝子は、タンパク質デスモブラキン、デスモソームの成分、隣接細胞を強く連結させ他のタンパク質(プラコゴビン及びプラコフィリン)と動的構造を形成する接着性細胞間分子をコードする。デスモソームは、力学的ストレスを受ける組織(肺の末梢部など)の完全性を維持するために特に重要であり、デスモソームの摂動が上皮恒常性を断絶することの強力な証拠がある。DSPにおける突然変異は、催不整脈性右室形成、角皮症、及び脱毛症と関連付けられ、このことは、組織完全性の喪失を持つ疾患中のデスモブラキンを直接的に暗示した。より具体的には、DSPにおける突然変異は、マウス心臓組織中の過剰発現に基づいて心間質性線維症と関連付けられた。DSPの関与に対するさらなる可能性のある機序は、肺線維症において一貫して観察されている、wnt / カテニンシグナル伝達経路の改変によってである。デスモブラキンは、デスモソームの別の成分であるカテニンの調節によってwnt / カテニンシグナル伝達経路に影響することが示された。これらの研究、及びIIPにおけるDSPの過剰発現がrs2076295の変異体対立遺伝子と関連付けられるという発見は、肺線維症の一因となるDSPにおける遺伝的変異の役割についての強力な生体力学的または生物学的論拠を提供する。

30

40

【0302】

結果は、IIP発症の危険性における他の細胞接着分子に関係する。DPP9遺伝子は、線維芽細胞活性化タンパク質と同じタンパク質ファミリーのメンバーであり、IPFにおいて線維芽細胞病巣において発現されるが、健常な肺の隣では発現されないことが示さ

50

れている。DPP9は、上皮組織中で発現され、ヒト胎児由来腎臓細胞中の細胞接着を変化させることが示されている。加えて、ある特定のカドヘリン関連タンパク質 3 (CTNNA3) 遺伝子は、共同分析においてほぼ有意であり ($P_{meta} = 9.8 \times 10^{-07}$)、10q22に位置し、 α -カテニンと物理的に相互作用し、細胞接着を媒介する細胞接着分子である。まとめると、これらの発見は、肺線維症が、肺の機械的伸縮に関連付けられる応力を提供することができない細胞間接着における欠損または細胞骨格における欠損によって引き起こされることを示唆する。

【0303】

FAM13Aは、低酸素症に応答性のシグナル形質導入遺伝子であり、その遺伝子中のSNP (rs7671167) は、近年、慢性閉塞性肺疾患において保護的であることが発見された。他のゲノムワイドで有意な遺伝子座は、興味深い候補が現れるが、同様にはシグナル遺伝子に局所化されない。IIPに関連付けられるいくつかのマーカーが存在し、それらは、全て1.14Mbにおよぶ染色体17q21の強いLD中にある。それらの遺伝子の中の明らかな候補は、IIPにおいて観察されるWntシグナリングの改変が与えられるWNT3遺伝子であるが、しかしながら、肺におけるWNT3発現の証拠は発見されなかった。17q21は、大きい(1Mb超)反転遺伝子多型及び疾患に関連付けられるより小さいコピー数変異体(CNV)を有する構造的に複雑な遺伝子領域である。興味深いことに、この領域中の遺伝子LRRC37A及びLRRC37A2は、複製試料中で最も強い関連シグナルのうちの1つを有する、TERC遺伝子に隣接する染色体3上のLRRC34遺伝子と同じファミリーである。染色体17q21領域及び染色体11p15上の複合体ムチン領域の両方において、その後、推定遺伝子/対立遺伝子/CNVの機能試験が続く、ディープシーケンシング及びアレイベースのコピー数測定値が、IIPとの関連性が観察されるものの遺伝子構成をさらに特徴付けるために必要となるだろうと思われる。肺線維症は発症経路の活性化または異常な肺修復の結果として生じることが提案されているが、この発見は、これらの機構が、宿主防御または細胞間接着の最初の欠損に続発することを示唆する。肺上皮組織(DSP、DPP9、及びCTNNA3)ならびに肺ムチン(MUC5B)の完全性に関与する遺伝子が遺伝的に危険な変異体であることから、これらの機構の欠損は、肺線維症の発症に対する主要な一因であり得る。間質性肺疾患の他の形態の発症における環境曝露(例えば、煙草の煙、アスベスト、及びシリカへの曝露)の重要性を考えると、長年にわたる煙草の煙または大気汚染に関連付けられるものの等の一般的な吸引粒子が、肺の宿主防御または細胞間接着の欠損を有する者において悪化した間質性傷害を引き起こすことは論理的である。短縮されたテロメア、及びそれに続く早期細胞老化は、宿主防御を変え得るか、または、アスベストまたは煙草の煙に類似する肺への「宿主防御の困難」を高める。このため、増加した環境曝露、極めて重要な恒常性維持機構の内在性の欠損、または宿主防御のわずかな欠損のいずれかを通じた過度の肺傷害は、何年にもわたって、肺線維症の発症を引き起こし得る。この複雑な疾患のための薬物につながる標的を考える場合、宿主防御及び細胞間接着により注意が向けられるべきである。

【0304】

本発見は、将来のIIPの遺伝的、診断的、及び薬理学的研究に実質的に影響するに違いない。本明細書で報告される累積するGWAS SNPは、IIPを発症する危険性における変動性の約3分の1を説明し、稀な変異、後成的特徴、及び遺伝子環境相互作用の研究に加えて、より大きいコホートを有する一般的な変異のさらなる検査が正当化されることを示唆する。これらの疾患の臨床的兆候は明確に定義されているが、IIPの各々の型が複数の遺伝子変異体によって引き起こされ、はっきりと異なる予後診断を有する可能性があり、薬理学的介入に異なって応答し得ることは、次第に明らかになってくる。結果として、将来の治療的試験におけるIIP対象の遺伝子型決定は、選択的患者において有効である薬剤を特定することによって、薬物開発を提供することができる。実際、IIP試験における遺伝薬理学的アプローチへの注目の欠如は、なぜこれらの疾患の過程を変えることが確認された薬物がほとんどないのかを説明することができる。さらに、IIPの

10

20

30

40

50

遺伝子異質性は、遺伝的変異体の特徴付けが、患者及びその家族に対するより正確な予後診断的情報を提供することができるように、I I Pの型の再定義において有用であることを示唆する。

【 0 3 0 5 】

本明細書に記載される実施例及び実施形態は例示目的のみであり、それらの関連から種々の修正及び変更が、当業者に示唆され、それらが本明細書の趣旨及び範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれることが理解される。本明細書に引用される全ての刊行物、特許、特許出願、ウェブサイト、及びデータベースは、あらゆる目的のために、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 3 0 6 】

【表 1】

表 1 : 発見GWASにおけるゲノムワイドで有意な遺伝子座 (GWAS P値 $<5 \times 10^{-8}$)

				発見 GWAS				複製				メタ分析
	位置 ^a	遺伝子 ^b	マイナー対立遺伝子	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値 ^c	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値 ^c	P 値 ^c
加法モデル GWAS(P 値<5×10 ⁻⁸)												
染色体 5p15												
rs2736100	1339516	TERT	C	0.43	0.51	0.73 (0.67、0.79)	7.60e-14	0.43	0.50	0.74 (0.66、0.85)	5.59e-06	2.27e-18
染色体 6p24												
rs2076295	7508231	DSP	T	0.54	0.44	1.43 (1.32、1.55)	1.14e-16	0.52	0.46	1.26 (1.11、1.42)	3.00e-04	4.74e-19
rs3778337	7510884	DSP	A	0.35	0.28	1.31 (1.20、1.43)	6.41e-09	0.32	0.30	1.08 (0.95、1.24)	0.25	4.01e-08
染色体 7q22												
rs4727443	99431282		A	0.46	0.39	1.30 (1.20、1.41)	6.72e-09	0.42	0.40	1.12 (0.98、1.27)	0.088	7.18e-09
染色体 11p15												
rs868903	1199266		T	0.38	0.49	0.64 (0.59、0.70)	1.26e-22	0.40	0.48	0.74 (0.65、0.84)	4.25e-06	9.27e-27
rs7934606	1083945	MUC2	C	0.52	0.42	1.52 (1.40、1.65)	5.46e-22	0.51	0.40	1.59 (1.40、1.81)	9.38e-13	4.80e-33
rs6421972	1086494	MUC2	C	0.52	0.42	1.51 (1.39、1.64)	1.62e-21	0.51	0.40	1.59 (1.40、1.80)	1.09e-12	1.70e-32
rs7480563	1091649	MUC2	C	0.42	0.51	0.69 (0.64、0.75)	4.17e-18	0.45	0.50	0.83 (0.73、0.94)	0.0036	8.75e-19
rs7942850	1058900		C	0.46	0.38	1.38 (1.27、1.50)	9.29e-14	0.42	0.39	1.16 (1.02、1.32)	0.026	8.87e-14
rs4077759	1095976		C	0.30	0.37	0.74	8.47e-13	0.33	0.36	0.87	0.032	8.16e-13

10

20

30

40

【 0 3 0 7 】

				発見 GWAS				複製				メタ分析
rs2334659	1313639		A	0.12	0.16	0.71 (0.63, 0.80)	4.71e-09	0.12	0.17	0.68 (0.56, 0.81)	3.67e-05	8.01e-13
rs7122936	1331032		C	0.33	0.40	0.76 (0.69, 0.82)	3.69e-08	0.33	0.39	0.76 (0.67, 0.87)	6.18e-05	1.05e-11
染色体 15q14-15												
rs2034650	38504594		G	0.42	0.49	0.77 (0.71, 0.84)	1.86e-09	0.40	0.47	0.74 (0.65, 0.83)	1.74e-06	2.06e-14
rs1992272	38446262	DISP2	T	0.29	0.35	0.78 (0.71, 0.85)	3.49e-08	0.27	0.33	0.77 (0.67, 0.88)	2.00e-04	2.96e-11
染色体 17q21												
rs1981997	41412603	MAPT	A	0.17	0.23	0.71 (0.64, 0.78)	2.52e-08	0.17	0.22	0.72 (0.61, 0.85)	7.02e-05	7.95e-12
rs17563986	41347100	MAPT	G	0.17	0.23	0.71 (0.64, 0.78)	3.39e-08	0.17	0.22	0.68 (0.61, 0.85)	9.32e-05	1.39e-11
rs8070723	41436901	MAPT	G	0.17	0.23	0.71 (0.64, 0.79)	3.87e-08	0.18	0.22	0.74 (0.63, 0.87)	0.00027	4.21e-11
染色体 19p13												
rs12610495	4668672	DPP9	G	0.34	0.29	1.29 (1.18, 1.41)	9.57e-09	0.34	0.28	1.32 (1.15, 1.51)	5.14e-05	2.24e-12
rs2109069	4670443	DPP9	A	0.36	0.31	1.28 (1.18, 1.40)	1.22e-08	0.35	0.30	1.24 (1.09, 1.42)	0.0013	6.49e-11
劣性モデル GWAS(P 値<5×10 ⁻⁸)												
染色体 8p23												
rs1379326	4605218	CSMD1	C	0.29	0.26	1.78 (1.45, 2.19)	5.74e-09	0.28	0.26	1.21 (0.87, 1.68)	0.25	3.75e-08

^a NCBI Build 36に基づく。^b SNPが遺伝子のコード化領域内に入る場合の遺伝子の名称。^c性別に合わせて調整済み。

MAF：マイナー対立遺伝子頻度、組み合わせた症例及び対照群におけるマイナー対立遺伝子として定義されたマイナー対立遺伝子、O

R：マイナー対立遺伝子についてのオッズ比、CI：信頼区間

【表 2】

表 2 : メタ分析からのゲノムワイドで有意な遺伝子座 (GWAS $5 \times 10^{-8} < P$ 値 < .0001、及びメタ分析 P 値 < 5×10^{-8})

	位置 ^a	遺伝子 ^b	マイナー対立遺伝子	発見 GWAS			複製			メタ分析		
				MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値 ^c	MAF 症例	MAF 対照		OR (95% CI)	P 値 ^c
染色体 3q26												
rs1881984	170947153		G	0.39	0.33	1.26 (1.16、1.37)	3.60e-06	0.38	0.33	1.21 (1.06、1.38)	0.0049	6.09e-08
rs10936599	170974795	MYNN	T	0.30	0.24	1.30 (1.19、1.43)	3.90e-07	0.30	0.24	1.35 (1.17、1.55)	2.58e-05	5.77e-11
rs1997392	170992346		T	0.32	0.26	1.30 (1.19、1.42)	3.71e-07	0.33	0.26	1.34 (1.17、1.53)	2.77e-05	5.81e-11
rs6793295	171001149	LRRC34	C	0.32	0.26	1.30 (1.19、1.42)	3.20e-07	0.33	0.26	1.37 (1.20、1.56)	5.34e-06	1.30e-11
染色体 4q22												
rs2609255	90030218	FAM13A	G	0.26	0.21	1.29 (1.18、1.42)	5.27e-06	0.28	0.21	1.47 (1.27、1.70)	2.40e-07	3.17e-11
染色体 5p15												
rs2853676	1341547	TERT	T	0.23	0.28	0.77 (0.70、0.84)	8.93e-07	0.24	0.26	0.86 (0.75、0.99)	0.043	1.77e-07
染色体 6p24												
rs10484326	7503317	DSP	C	0.20	0.25	0.77 (0.70、	3.41e-07	0.22	0.24	0.84 (0.73、	0.025	5.45e-09

10

20

30

40

	位置 ^a	遺伝子 ^b	マイナー対立遺伝子	発見 GWAS				複製				メタ分析
				MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値 ^c	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値 ^c	
染色体 10q24												
rs10748858	105629504	OBFC1	G	0.36	0.41	0.81 (0.74、0.88)	1.24e-05	0.35	0.40	0.80 (0.70、0.91)	9.00e-4	4.37e-08
rs2067832	105633124	OBFC1	G	0.45	0.5	0.80 (0.74、0.87)	4.73e-07	0.46	0.49	0.86 (0.76、0.97)	0.017	3.28e-08
rs11191865	105662832	OBFC1	G	0.45	0.51	0.80 (0.74、0.87)	2.82e-07	0.46	0.50	0.86 (0.76、0.97)	0.017	2.11e-08
染色体 11p15												
rs2301160	1053767		C	0.48	0.43	1.25 (1.15、1.35)	1.90e-07	0.47	0.42	1.20 (1.06、1.36)	0.0043	3.15e-09
rs3829223	1256982	TOLLIP	C	0.43	0.49	0.78 (0.72、0.84)	7.52e-07	0.45	0.50	0.82 (0.72、0.93)	0.0015	4.12e-09
rs2857476	1237710	MUC5B	C	0.44	0.50	0.78 (0.71、0.84)	1.62e-06	0.46	0.51	0.85 (0.75、0.96)	0.01	6.02e-08
染色体 13q34												
rs1278769	112584628	ATP11A	A	0.20	0.24	0.79 (0.72、0.88)	9.11e-07	0.20	0.24	0.80 (0.68、0.92)	0.0029	9.56e-09

10

20

30

40

	位置 ^a	遺伝子 ^b	マイナ ー対立 遺伝子	発見 GWAS				複製				メタ分析
				MAF 症 例	MAF 対 照	OR (95% CI)	P 値 ^c	MAF 症 例	MAF 対 照	OR (95% CI)	P 値 ^c	
染色体 15q14-15												
rs1007177	38439130	DISP2	A	0.29	0.34	0.78 (0.71, 0.85)	5.59e-08	0.27	0.33	0.75 (0.66, 0.87)	7.94e-05	2.01e-11
rs10518693	38487314	IVD	T	0.44	0.39	1.23 (1.14, 1.34)	2.93e-06	0.47	0.41	1.30 (1.14, 1.48)	6.52e-05	1.07e-09
染色体 17q21												
rs393152	41074926	CRHR1,C 17orf69	G	0.17	0.23	0.72 (0.65, 0.80)	9.26e-08	0.19	0.22	0.82 (0.70, 0.96)	0.016	7.27e-09
rs12373139	41279910	IMP5	A	0.17	0.22	0.71 (0.64, 0.79)	7.07e-08	0.17	0.22	0.72 (0.61, 0.85)	8.81e-05	2.80e-11
rs17690703	41281077	LOC1001 28977	T	0.21	0.26	0.78 (0.71, 0.86)	3.42e-05	0.21	0.25	0.79 (0.68, 0.92)	0.0027	3.24e-07
rs2532274	41602941	KIAA126 7	G	0.17	0.23	0.72 (0.65, 0.80)	1.29e-07	0.18	0.23	0.73 (0.62, 0.85)	9.79e-05	5.71e-11
rs2532269	41605885	KIAA126 7	C	0.17	0.23	0.71 (0.64, 0.79)	9.61e-08	0.17	0.22	0.71 (0.60, 0.83)	2.71e-05	1.37e-11
rs2668692	41648797	KIAA126 7	A	0.17	0.22	0.71 (0.64, 0.79)	1.04e-07	0.17	0.22	0.72 (0.61, 0.85)	7.64e-05	3.66e-11

10

20

30

40

【 0 3 0 8 】

			発見 GWAS				複製				メタ分析		
			マイナー対立遺伝子 ^b	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値 ^c	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値 ^c		
rs169201	位置 ^a	42145386	NSF	G	0.16	0.21	0.71 (0.64、0.79)	2.33e-07	0.16	0.20	0.74 (0.63、0.88)	0.00051	4.63e-10
rs199533		42184098	NSF	A	0.16	0.21	0.72 (0.64、0.80)	5.19e-07	0.16	0.20	0.74 (0.62、0.87)	0.00035	7.38e-10
rs415430		42214305	WNT3	C	0.16	0.21	0.72 (0.65、0.80)	7.86e-07	0.17	0.21	0.77 (0.65、0.91)	0.0021	6.03e-09

^a NCBI Build 36に基づく。^b SNPが遺伝子のコード化領域内に入る場合の遺伝子の名称。^c性別に合わせて調整済み。

MAF：マイナー対立遺伝子頻度、組み合わせた症例及び対照群におけるマイナー対立遺伝子として定義されたマイナー対立遺伝子、O

R：マイナー対立遺伝子についてのオッズ比、CI：信頼区間

10

20

30

40

【表 3】

表 3 : 複製集合に取り入れた 1 9 8 個全ての S N P に対する発見集合における症例及び対
照中の遺伝子型計数及びハーディー・ワインベルグ平衡 (HWE) P 値。

染色体 SNP	位置 ^a	対立遺 伝子 ^b	症例				対照			
			マイナ ー ^c	ヘテ ロ ^d	メジャ ー ^e	HWE P ^f	マイナ ー ^c	ヘテロ ^d	メジャ ー ^e	HWE P ^f
染色体 1										
rs12128329	64698479	A/G	207	783	625	0.12	525	1983	1991	0.37
rs1995785	161599245	A/G	81	503	1031	0.06	127	1304	3065	0.43
rs6428467	196777745	C/A	62	532	1022	0.54	125	1250	3125	1.00
rs7525504	221934254	G/A	240	841	534	<0.01	879	2181	1437	0.32
rs3738383	221972155	G/A	41	556	1019	<0.01	239	1532	2728	0.21
染色体 2										
rs17247006	2511991	A/G	30	423	1163	0.28	79	960	3459	0.19
rs10495536	6498196	A/G	49	458	1109	0.86	159	1496	2842	0.03
rs2354382	51680424	C/T	19	305	1287	0.79	30	679	3774	1.00
rs1879219	76771091	G/A	180	689	746	0.28	593	2068	1825	0.85
rs1369523	125855752	T/C	56	458	1101	0.35	204	1468	2815	0.47
rs1836676	125858674	A/G	57	458	1100	0.27	205	1468	2809	0.47
rs10174598	140429825	C/T	271	714	631	<0.01	580	2101	1815	0.48
rs12469218	148949526	A/G	97	522	996	0.01	162	1469	2868	0.12
rs7578722	169761122	C/T	154	613	848	0.01	274	1782	2442	0.03
rs4668123	169761751	T/C	154	613	849	0.01	274	1782	2441	0.03
rs2302696	169761826	T/C	158	620	838	0.01	284	1808	2408	0.02
rs11687903	169765968	G/T	167	635	813	0.01	310	1860	2326	0.02
rs2284675	169767205	A/G	166	632	814	0.01	303	1861	2333	0.01
rs9646792	176546391	A/C	348	732	536	<0.01	773	2239	1487	0.17
rs13415895	240625254	C/A	67	540	1009	0.65	145	1333	3006	0.88
染色体 3										
rs13091584	7380044	C/T	391	878	347	<0.01	1074	2212	1211	0.31
rs12638703	9227998	T/C	43	494	1078	0.15	93	1135	3268	0.68
rs1532898	44897145	C/A	189	674	753	0.05	346	1856	2298	0.29
rs6798211	69670985	T/C	26	409	1181	0.19	113	1303	3083	0.08
rs697954	109117605	G/A	374	774	468	0.12	1165	2248	1079	0.95
rs1881984	170947153	G/A	245	759	611	0.71	488	2013	1985	0.52
rs10936599	170974795	T/C	143	669	804	0.81	260	1668	2572	0.66
rs1997392	170992346	T/C	162	706	748	0.86	317	1735	2448	0.70
rs6793295	171001149	C/T	162	711	743	0.69	320	1740	2440	0.67
rs9844738	185664502	T/C	96	566	954	0.33	332	1760	2405	0.68
染色体 4										

10

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立遺 伝子 ^b	症例				対照			
			マイナ ー ^c	ヘテ ロ ^d	メジヤ ー ^e	HWE P ^f	マイナ ー ^c	ヘテロ ^d	メジヤ ー ^e	HWE P ^f
rs4518326	13069051	A/G	16	415	1183	<0.01	107	1078	3309	0.09
rs16877848	25584209	T/C	20	428	1168	<0.01	138	1173	3187	0.02
rs340199	86569707	C/A	216	678	722	0.01	632	2126	1730	0.61
rs2869358	86600804	G/A	180	681	754	0.17	528	2140	1826	0.01
rs4488910	87581858	C/T	27	363	1226	1.00	117	1188	3194	0.61
rs6830970	89996104	G/A	156	686	774	0.82	596	2053	1849	0.50
rs2609255	90030218	G/T	121	602	891	0.18	222	1445	2816	0.04
rs10019681	90051555	T/C	58	509	1047	0.75	251	1645	2602	0.71
rs2869967	90088355	C/T	210	707	699	0.14	769	2139	1592	0.27
rs7671167	90103002	T/C	326	776	506	0.36	1177	2201	1114	0.19
rs1921679	90109807	T/C	124	681	811	0.27	494	1989	2017	0.92
rs16996143	90116382	A/G	124	679	810	0.27	501	1981	2010	0.71
rs11737182	90117499	T/C	124	682	810	0.25	499	1990	2011	0.84
rs6849143	90147512	T/C	219	726	671	0.31	790	2120	1589	0.07
rs12505696	90150093	T/C	277	754	585	0.22	584	2001	1911	0.10
rs6828137	90278457	T/G	300	780	536	0.58	1042	2169	1287	0.03
rs756345	90292237	A/G	167	669	779	0.20	587	2059	1850	0.72
rs11727778	102641245	C/T	88	581	947	1.00	169	1450	2881	0.45
rs2130910	187823204	C/T	378	764	474	0.04	1148	2279	1071	0.37
染色体 5										
rs2736100	1339516	C/A	329	731	556	<0.01	1154	2287	1059	0.27
rs2853676	1341547	T/C	80	571	964	0.78	340	1803	2356	0.88
rs30364	55865133	T/G	319	790	507	0.72	1012	2264	1211	0.47
rs9326761	108497343	G/A	160	756	700	0.03	431	1830	2239	0.05
rs2217649	108502065	G/A	90	614	912	0.35	205	1490	2805	0.69
rs13385	139693062	A/G	75	523	1018	0.45	241	1677	2582	0.15
rs31874	140349502	C/T	135	601	880	0.03	416	1904	2180	1.00
rs702390	140422393	A/G	298	727	591	0.01	890	2264	1346	0.28
rs31850	140459806	G/A	367	759	490	0.03	1118	2256	1126	0.88
rs2963163	161634659	T/C	6	202	1408	0.84	28	727	3743	0.30
染色体 6										
rs4959432	7336920	G/A	10	247	1359	0.87	23	531	3946	0.26
rs10484325	7502047	C/T	52	513	1051	0.30	108	1208	3182	0.65
rs10484326	7503317	C/T	68	520	1028	0.82	288	1666	2546	0.50
rs2076295	7508231	G/T	479	777	359	0.19	889	2219	1385	1.00
rs3778337	7510884	A/G	200	718	698	0.47	346	1869	2285	0.19
rs2076302	7515962	A/G	65	474	1073	0.16	246	1561	2688	0.33

10

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立遺 伝子 ^b	症例				対照			
			マイナ ー ^c	ヘテ ロ ^d	メジヤ ー ^e	HWE P ^f	マイナ ー ^c	ヘテロ ^d	メジヤ ー ^e	HWE P ^f
rs3134603	32233980	A/G	34	432	1150	0.45	72	949	3476	0.44
rs3134943	32255739	T/C	30	445	1139	0.09	76	973	3449	0.45
rs3132946	32298006	A/G	27	436	1152	0.05	71	944	3485	0.44
rs9267992	32328375	G/A	34	454	1128	0.14	81	1008	3410	0.51
rs3129860	32509057	A/G	38	464	1111	0.21	75	1006	3409	0.95
rs9271366	32694832	G/A	38	459	1119	0.28	76	1008	3415	0.84
rs6911621	35637003	T/C	125	687	803	0.20	488	2009	2000	0.64
rs2766535	35799760	A/G	422	803	390	0.84	984	2240	1274	1.00
rs961918	100762389	C/T	169	660	787	0.08	342	1711	2447	0.08
rs1932103	130461745	A/G	14	343	1259	0.09	46	746	3706	0.22
染色体 7										
rs13225346	1833442	C/T	381	821	414	0.52	855	2252	1379	0.24
rs7783715	1889911	T/C	287	753	576	0.14	594	2162	1735	0.05
rs4994763	1895349	C/T	298	763	546	0.28	643	2176	1653	0.09
rs962060	31361662	C/T	41	504	1071	0.04	124	1157	3218	0.11
rs2283017	99412694	G/A	331	792	493	0.69	711	2109	1673	0.29
rs4727443	99431282	A/C	338	813	465	0.65	711	2121	1657	0.45
rs941289	99516427	G/A	184	710	722	0.65	397	1820	2282	0.22
rs2261360	99530929	T/G	146	658	812	0.44	284	1633	2582	0.24
rs720547	123862730	G/A	104	632	880	0.56	226	1563	2707	1.00
染色体 8										
rs1379326	4605218	C/T	164	621	831	<0.01	269	1824	2405	<0.01
rs9650356	15796632	A/G	54	548	1014	0.05	138	1273	3088	0.64
rs17577994	20930275	A/G	174	632	810	<0.01	354	1813	2331	0.97
rs10504290	60315650	A/G	62	397	1157	<0.01	91	1200	3203	0.09
rs6471845	61011882	T/G	215	706	695	0.10	672	2174	1652	0.33
rs979564	79738714	T/C	81	555	980	0.83	151	1403	2943	0.33
rs279968	94129515	C/A	396	750	470	0.01	891	2346	1262	<0.01
rs1467044	120956222	G/A	298	753	561	0.11	967	2211	1305	0.59
rs11781657	120958423	G/T	298	754	564	0.10	965	2218	1314	0.61
rs9987332	121003144	A/G	254	749	613	0.32	852	2179	1468	0.39
rs7005380	121023054	A/G	166	695	755	0.73	617	2051	1831	0.27
染色体 9										
rs7022345	7163752	A/G	27	454	1135	0.01	158	1303	3038	0.21
rs2820917	7182313	A/G	19	432	1165	<0.01	125	1186	3188	0.24
rs10963084	17394464	T/C	152	607	857	<0.01	281	1824	2394	0.01
rs541131	137692055	G/A	278	804	534	0.41	627	2140	1732	0.43

10

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立遺 伝子 ^b	症例				対照			
			マイナ ー ^c	ヘテ ロ ^d	メジヤ ー ^e	HWE P ^f	マイナ ー ^c	ヘテロ ^d	メジヤ ー ^e	HWE P ^f
染色体 10										
rs2441727	67894892	G/A	6	217	1391	0.57	8	471	4010	0.15
rs10997263	68052141	C/A	232	791	593	0.23	601	1982	1917	0.01
rs10822856	68053979	C/T	231	788	595	0.27	600	1974	1920	0.01
rs2901088	92431533	T/C	166	708	741	0.91	566	2141	1790	0.06
rs1936606	92432636	T/C	166	708	742	0.91	565	2139	1788	0.06
rs1936602	92435233	T/C	247	764	605	0.83	807	2277	1412	0.04
rs2902638	105626979	C/T	125	679	812	0.33	262	1670	2567	0.69
rs10748858	105629504	G/T	221	721	674	0.21	772	2145	1582	0.34
rs2067832	105633124	G/A	335	777	502	0.29	1138	2258	1103	0.81
rs1980653	105644154	A/G	334	778	501	0.31	1138	2256	1103	0.83
rs11191865	105662832	G/A	340	774	502	0.19	1159	2235	1105	0.68
rs9419958	105665936	T/C	18	319	1279	0.80	73	1125	3302	0.04
rs9420907	105666455	C/A	18	319	1279	0.80	73	1124	3302	0.04
rs7074532	105692032	G/T	167	680	769	0.36	327	1776	2395	0.97
rs7073827	105698783	C/T	183	704	728	0.54	361	1837	2287	0.80
染色体 11										
rs10751635	1052990	G/A	380	804	431	0.92	824	2183	1483	0.69
rs2301160	1053767	C/T	379	808	429	1.00	826	2185	1482	0.69
rs7942850	1058900	C/T	346	801	469	0.92	642	2156	1702	0.34
rs2071174	1063712	C/T	121	677	818	0.25	497	2016	1979	0.64
rs7396030	1073364	A/G	41	431	1140	1.00	199	1423	2862	0.20
rs7103978	1078815	G/A	2	218	1396	0.03	42	764	3694	0.73
rs7934606	1083945	T/C	430	825	361	0.37	794	2179	1521	0.78
rs6421972	1086494	T/C	428	820	363	0.45	794	2178	1518	0.81
rs7480563	1091649	C/T	270	811	535	0.22	1165	2220	1092	0.59
rs4077759	1095976	C/T	153	675	788	0.64	614	2107	1775	0.80
rs6421966	1116979	G/T	32	410	1174	0.69	140	1292	3044	0.84
rs868903	1199266	T/C	219	788	604	0.14	1057	2260	1172	0.63
rs2735727	1214035	A/G	232	773	611	0.64	885	2186	1415	0.45
rs2857476	1237710	C/T	296	836	484	0.06	1156	2219	1123	0.37
rs12417955	1240803	G/A	295	830	490	0.09	1151	2202	1130	0.24
rs3829223	1256982	C/T	298	800	517	0.72	1110	2211	1155	0.42
rs3793964	1258558	T/C	171	682	763	0.33	656	2081	1760	0.31
rs2334659	1313639	A/G	20	349	1247	0.48	127	1218	3153	0.48
rs7122936	1331032	C/A	168	733	713	0.34	710	2129	1653	0.57
rs7944761	1361414	C/T	256	775	585	1.00	891	2242	1362	0.59

10

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立遺 伝子 ^b	症例				対照			
			マイナ ー ^c	ヘテ ロ ^d	メジャ ー ^e	HWE P ^f	マイナ ー ^c	ヘテロ ^d	メジャ ー ^e	HWE P ^f
rs4752744	1674842	G/A	13	286	1317	0.67	23	599	3878	1.00
rs11036021	40668015	T/G	438	818	360	0.58	1051	2206	1238	0.27
rs2736601	61462097	T/C	11	248	1357	1.00	19	539	3942	0.90
rs2727267	61462692	A/G	11	248	1357	1.00	19	539	3942	0.90
染色体 12										
rs12310569	6567614	A/G	46	483	1087	0.44	113	1115	3270	0.13
rs10845459	12099918	G/A	335	844	436	0.05	1147	2193	1157	0.10
染色体 13										
rs1278760	112579676	T/C	166	748	702	0.12	633	2073	1773	0.50
rs1278769	112584628	A/G	62	535	1018	0.44	270	1647	2565	0.81
染色体 14										
rs12879458	45894992	T/C	58	476	1080	0.56	104	1157	3237	0.95
rs10139381	46152755	C/T	76	621	919	0.03	363	1736	2389	0.06
rs2781413	97038740	C/T	110	598	904	0.43	412	1807	2275	0.05
rs1552126	97063843	C/T	317	835	464	0.10	790	2147	1560	0.28
染色体 15										
rs1007177	38439130	A/G	145	650	821	0.33	550	1997	1949	0.28
rs1992272	38446262	T/C	149	644	823	0.17	558	1994	1946	0.18
rs2289332	38471072	G/A	249	715	650	0.03	809	2149	1540	0.22
rs11636361	38475120	G/A	262	720	634	0.02	849	2174	1470	0.38
rs10518693	38487314	T/C	331	756	529	0.04	714	2073	1713	0.04
rs2034650	38504594	G/A	304	751	558	0.07	1090	2193	1215	0.11
rs603104	38544327	A/C	285	785	544	0.96	960	2235	1301	1.00
rs1849210	52413032	G/A	96	514	1006	0.01	159	1483	2856	0.05
rs351219	72276260	C/T	187	795	634	0.01	675	2063	1756	0.09
rs6496932	83626571	A/C	46	432	1136	0.52	178	1371	2938	0.25
rs1828481	83641916	C/A	315	763	538	0.14	637	2126	1735	0.75
rs7172789	83644521	C/T	315	761	539	0.12	636	2122	1732	0.75
rs11858744	83684068	T/C	315	758	539	0.10	636	2118	1736	0.82
rs16977252	83727844	G/A	152	660	804	0.34	286	1712	2502	0.78
rs6496044	83868310	G/A	260	729	627	0.05	491	2022	1986	0.50
rs10520597	83971259	A/G	228	730	658	0.26	439	1995	2065	0.18
rs11633855	96054298	C/T	246	722	648	0.06	528	2082	1887	0.21
rs1441479	96057306	C/T	241	724	651	0.09	516	2076	1890	0.14
染色体 16										
rs17139255	6047175	G/T	61	498	1057	0.81	115	1233	3148	0.70
rs1548857	6576606	A/C	9	230	1375	1.00	19	493	3988	0.35

10

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立遺 伝子 ^b	症例				対照			
			マイナ ー ^c	ヘテ ロ ^d	メジャ ー ^e	HWE P ^f	マイナ ー ^c	ヘテロ ^d	メジャ ー ^e	HWE P ^f
rs4843650	86240987	G/A	223	802	591	0.07	794	2172	1530	0.62
染色体 17										
rs393152	41074926	G/A	56	439	1121	0.11	243	1549	2707	0.27
rs417968	41084159	G/A	72	541	1003	1.00	328	1688	2484	0.08
rs1635291	41107696	G/A	62	507	1047	0.94	298	1629	2570	0.07
rs7215239	41123556	C/T	60	506	1050	1.00	294	1629	2572	0.10
rs12373139	41279910	A/G	55	433	1127	0.11	240	1534	2721	0.21
rs17690703	41281077	T/C	78	523	1015	0.33	339	1638	2511	<0.01
rs17563986	41347100	G/A	54	434	1127	0.13	242	1539	2711	0.23
rs1981997	41412603	A/G	54	433	1128	0.13	241	1544	2715	0.27
rs8070723	41436901	G/A	54	436	1126	0.15	241	1546	2713	0.29
rs7225002	41544850	G/A	201	735	679	0.91	761	2164	1572	0.73
rs2532274	41602941	G/A	57	449	1107	0.17	247	1578	2664	0.50
rs2532269	41605885	C/T	55	439	1117	0.16	243	1551	2697	0.31
rs2668692	41648797	A/G	54	425	1121	0.09	241	1497	2704	0.08
rs183211	42143493	A/G	52	503	1061	0.46	277	1592	2631	0.08
rs169201	42145386	G/A	42	422	1152	0.64	216	1466	2814	0.17
rs7224296	42155230	G/A	89	556	971	0.44	379	1738	2381	0.02
rs199533	42184098	A/G	42	423	1147	0.71	212	1469	2817	0.24
rs415430	42214305	C/T	40	435	1139	0.93	207	1488	2797	0.62
染色体 18										
rs367024	10388673	T/C	54	505	1057	0.57	128	1171	3201	0.10
染色体 19										
rs12610495	4668672	G/A	210	691	715	0.04	377	1875	2247	0.64
rs2109069	4670443	A/G	233	707	673	0.04	426	1944	2123	0.55
rs10417008	54895365	C/T	43	416	1157	0.45	156	1371	2966	0.92
rs306477	61181585	T/C	336	814	464	0.58	797	2165	1531	0.52
染色体 20										
rs2145275	6521455	T/C	336	754	526	0.03	751	2190	1557	0.71
rs6088520	32596025	T/C	333	817	466	0.48	1070	2322	1106	0.03
rs4810223	59179191	T/G	88	564	964	0.62	168	1379	2950	0.66
Chr.21										
rs2823529	16271144	C/T	63	408	1144	<0.01	102	1208	3189	0.34
rs2830234	26754202	G/T	277	839	500	0.02	744	2111	1643	0.14
Chr.23										
rs7879375	79014847	A/G	9	122	395	1.00	26	415	1861	0.57
rs3903350	79032104	A/G	12	136	378	1.00	34	471	1797	0.61

10

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立遺 伝子 ^b	症例				対照			
			マイナ ー ^c	ヘテ ロ ^d	メジヤ ー ^e	HWE P ^f	マイナ ー ^c	ヘテロ ^d	メジヤ ー ^e	HWE P ^f
rs5924874	150037033	G/A	104	264	158	0.79	391	1098	809	0.57

^aNCBI Build 36に基づくゲノムの位置

^b第1に挙げた症例のマイナー対立遺伝子。

^cマイナー：マイナー対立遺伝子対象の計数

^dヘテロ：ヘテロ接合型対象の計数

^eメジャー：メジャー対立遺伝子（より頻度の高い対立遺伝子）ホモ接合型対象の計数

^fHWE適合度試験に対するP値

10

【0309】

【表4】

表4：複製において遺伝子型決定に成功した全てのSNPに対する複製集合における症例及び対照中の遺伝子型計数及びハーディー・ワインベルク平衡（HWE）P値。

染色体 SNP	位置 ^a	対立 遺伝 子 ^b	症例				対照			
			マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メジ ヤー ^e	HWE P ^f	マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メジ ヤー ^e	HWE P ^f
染色体1										
rs12128329	64698479	A/G	101	383	391	0.65	232	874	779	0.61
rs1995785	161599245	T/C	43	271	556	0.18	75	582	1202	0.66
rs6428467	196777745	C/A	45	257	572	0.03	67	593	1224	0.71
rs7525504	221934254	G/A	177	426	266	0.78	393	870	603	0.02
Rs17596	223905532	G/A	53	317	504	0.71	105	666	1116	0.65
染色体2										
rs17247006	2511991	T/C	17	178	654	0.27	34	404	1420	0.40
rs10495536	6498196	A/G	45	288	541	0.42	64	545	1280	0.53
rs2354382	51680424	C/T	11	147	715	0.25	19	321	1544	0.59
rs1879219	76771091	C/T	115	396	354	0.83	238	844	790	0.61
rs1369523	125855752	T/C	36	280	557	0.92	83	566	1237	0.08
rs1836676	125858674	T/C	36	280	559	0.92	83	566	1238	0.08
rs10174598	140429825	C/T	135	395	342	0.25	269	913	696	0.28
rs12469218	148949526	A/G	36	295	541	0.68	79	606	1197	0.83
rs7578722	169761122	C/T	62	323	482	0.43	126	738	991	0.51
rs2302696	169761826	A/G	68	339	468	0.55	136	757	991	0.64
rs11687903	169765968	G/T	71	354	446	0.93	140	770	973	0.49
rs2284675	169767205	T/C	70	353	450	0.93	141	763	981	0.69
rs9646792	176546391	A/C	183	415	275	0.27	337	953	596	0.21
rs13415895	240625254	C/A	36	278	558	0.83	49	589	1242	0.04
染色体3										
rs13091584	7380044	C/T	195	436	239	0.95	486	925	474	0.43

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立 遺伝 子 ^b	症例				対照			
			マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メジ ヤー ^e	HWE p ^f	マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メジ ヤー ^e	HWE p ^f
rs12638703	9227998	T/C	18	242	612	0.38	34	500	1352	0.13
rs1532898	44897145	C/A	77	326	328	0.80	155	678	804	0.48
rs6798211	69670985	T/C	29	238	608	0.34	68	521	1299	0.09
rs697954	109117605	T/C	194	449	231	0.42	427	954	496	0.46
rs1881984	170947153	C/T	127	391	333	0.51	198	839	819	0.46
rs10936599	170974795	T/C	97	331	448	<0.01	89	717	1078	0.03
rs1997392	170992346	A/G	107	360	403	0.07	117	752	1014	0.17
rs6793295	171001149	C/T	114	357	404	0.01	117	753	1018	0.17
rs9844738	185664502	T/C	51	331	494	0.72	137	732	1018	0.72
染色体 4										
rs4518326	13069051	A/G	22	219	630	0.60	33	477	1372	0.30
rs16877848	25584209	T/C	26	225	625	0.31	59	534	1297	0.63
rs340199	86569707	C/A	130	395	347	0.31	237	940	707	0.01
rs4488910	87581858	C/T	22	217	637	0.50	45	483	1361	0.79
rs6830970	89996104	G/A	95	366	411	0.31	199	863	821	0.23
rs2609255	90030218	G/T	62	359	454	0.50	70	670	1148	0.02
rs10019681	90051555	T/C	36	313	527	0.24	98	659	1127	0.90
rs2869967	90088355	C/T	126	392	350	0.34	251	907	701	0.13
rs7671167	90103002	T/C	177	439	255	0.68	413	973	486	0.08
rs1921679	90109807	T/C	74	378	418	0.42	199	823	860	0.92
rs16996143	90116382	A/G	74	385	414	0.26	204	825	857	0.79
rs11737182	90117499	T/C	74	384	417	0.30	202	826	859	0.88
rs6849143	90147512	T/C	120	415	338	0.72	269	915	694	0.26
rs12505696	90150093	T/C	135	398	343	0.28	238	924	727	0.04
rs6828137	90278457	T/G	162	440	261	0.37	357	936	555	0.30
rs756345	90292237	T/C	96	376	396	0.64	196	876	802	0.06
rs11727778	102641245	C/T	30	274	570	0.74	75	645	1169	0.27
染色体 5										
rs2736100	1339516	G/T	152	434	275	0.40	474	924	470	0.64
rs2853676	1341547	A/G	51	297	520	0.34	133	722	1020	0.72
rs30364	55865133	A/C	193	455	224	0.20	402	955	525	0.43
rs9326761	108497343	G/A	76	374	418	0.57	171	802	904	0.74
rs2217649	108502065	C/T	31	294	529	0.25	72	642	1132	0.11
rs13385	139693062	T/C	40	297	536	1.00	89	677	1121	0.32
rs31874	140349502	C/T	72	312	488	0.04	149	782	954	0.54
rs702390	140422393	T/C	176	398	299	0.04	345	935	605	0.64
rs31850	140459806	C/T	217	421	235	0.31	430	954	499	0.55

10

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立 遺伝 子 ^b	症例				対照			
			マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メジ ヤー ^e	HWE P ^f	マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メジ ヤー ^e	HWE P ^f
rs2963163	161634659	A/G	2	129	738	0.22	8	281	1581	0.27
染色体 6										
rs4959432	7336920	G/A	9	133	729	0.28	8	259	1602	0.61
rs10484325	7502047	C/T	34	280	555	0.92	33	545	1302	<0.01
rs10484326	7503317	C/T	46	273	554	0.12	117	671	1097	0.28
rs2076295	7508231	G/T	253	412	211	0.09	413	924	552	0.49
rs3778337	7510884	A/G	80	391	404	0.31	165	792	922	0.83
rs2076302	7515962	A/G	33	257	583	0.50	103	615	1169	0.07
rs3134603	32233980	T/C	21	197	658	0.20	40	408	1442	0.08
rs3134943	32255739	A/G	20	207	648	0.48	40	401	1446	0.06
rs3132946	32298006	A/G	15	209	651	0.78	34	384	1469	0.13
rs9267992	32328375	G/A	16	214	641	0.78	35	412	1435	0.41
rs6911621	35637003	T/C	96	356	421	0.12	189	810	884	0.87
rs961918	100762389	G/A	72	355	446	0.93	127	769	993	0.20
rs1932103	130461745	T/C	10	161	704	0.85	19	343	1522	1.00
染色体 7										
rs13225346	1833442	C/T	198	408	260	0.12	373	941	559	0.54
rs7783715	1889911	T/C	145	390	333	0.10	273	887	722	1.00
rs4994763	1895349	C/T	143	404	329	0.32	295	900	692	0.92
rs962060	31361662	G/A	21	228	620	1.00	55	497	1327	0.31
rs2283017	99412694	G/A	173	388	314	0.01	269	940	679	0.05
rs4727443	99431282	A/C	171	394	311	0.02	278	938	668	0.08
rs941289	99516427	G/A	83	353	434	0.37	154	824	897	0.07
rs2261360	99530929	A/C	65	313	495	0.13	111	713	1061	0.58
rs720547	123862730	G/A	51	303	520	0.45	107	650	1131	0.30
染色体 8										
rs1379326	4605218	G/A	70	344	457	0.67	135	709	1029	0.40
rs9650356	15796632	A/G	17	278	580	0.01	69	553	1267	0.36
rs17577994	20930275	A/G	83	345	447	0.17	149	746	985	0.65
rs10504290	60315650	A/G	14	236	626	0.15	35	490	1360	0.27
rs6471845	61011882	T/G	136	400	338	0.35	265	866	753	0.52
rs979564	79738714	A/G	28	288	557	0.24	77	597	1206	0.77
rs279968	94129515	C/A	190	444	240	0.59	378	962	548	0.25
rs1467044	120956222	G/A	164	416	292	0.49	400	940	538	0.82
rs9987332	121003144	A/G	143	336	320	<0.01	346	741	621	<0.01
rs7005380	121023054	A/G	87	395	389	0.40	259	856	771	0.40
染色体 9										

10

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立 遺伝子 ^b	症例				対照			
			マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メジ ヤー ^e	HWE P ^f	マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メジ ヤー ^e	HWE P ^f
rs7022345	7163752	A/G	24	250	600	0.81	57	567	1258	0.53
rs2820917	7182313	T/C	20	222	629	0.89	47	527	1306	0.50
rs10963084	17394464	T/C	72	323	476	0.10	153	709	1015	0.07
rs541131	137692055	C/T	142	386	326	0.13	294	905	648	0.47
染色体 10										
rs2441727	67894892	G/A	14	127	731	0.01	15	228	1641	0.04
rs10997263	68052141	C/A	104	403	367	0.71	233	893	761	0.25
rs10822856	68053979	C/T	103	397	362	0.76	232	888	756	0.27
rs2901088	92431533	T/C	122	381	371	0.14	239	881	768	0.62
rs1936606	92432636	A/G	122	382	370	0.14	237	884	765	0.48
rs1936602	92435233	A/G	177	410	286	0.19	344	933	605	0.67
rs2902638	105626979	C/T	56	329	472	0.93	123	667	1040	0.26
rs10748858	105629504	G/T	113	385	375	0.37	284	920	677	0.34
rs2067832	105633124	C/T	182	437	252	0.79	461	940	480	1.00
rs1980653	105644154	T/C	177	433	240	0.49	455	931	465	0.82
rs11191865	105662832	G/A	186	436	252	0.95	469	940	476	0.93
rs9420907	105666455	C/A	19	188	654	0.23	33	453	1384	0.63
rs7074532	105692032	G/T	67	364	440	0.51	139	789	953	0.17
rs7073827	105698783	C/T	85	377	412	1.00	169	808	910	0.62
染色体 11										
rs10751635	1052990	G/A	188	415	260	0.37	357	895	612	0.37
rs2301160	1053767	C/T	186	424	256	0.68	342	909	628	0.67
rs7942850	1058900	G/A	144	427	294	0.62	274	909	685	0.36
rs2071174	1063712	C/T	98	370	405	0.35	183	834	863	0.40
rs7396030	1073364	T/C	38	270	562	0.46	79	604	1185	0.83
rs7103978	1078815	C/T	6	121	746	0.63	12	308	1567	0.57
rs7934606	1083945	A/G	220	450	204	0.42	295	920	673	0.53
rs6421972	1086494	A/G	220	448	206	0.50	291	918	676	0.50
rs7480563	1091649	G/A	195	406	266	0.10	462	936	476	0.96
rs4077759	1095976	C/T	117	359	400	0.01	229	900	755	0.12
rs6421966	1116979	C/A	34	236	593	0.10	63	562	1250	1.00
rs868903	1199266	T/C	152	410	310	0.44	420	947	509	0.64
rs2857476	1237710	C/T	186	435	250	0.95	490	922	468	0.41
rs12417955	1240803	G/A	183	434	251	0.89	479	913	465	0.49
rs3829223	1256982	C/T	171	438	266	0.73	471	935	470	0.89
rs2334659	1313639	T/C	8	198	651	0.12	56	502	1285	0.40
rs7122936	1331032	C/A	85	408	370	0.08	286	894	686	0.88

10

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立 遺伝 子 ^b	症例				対照			
			マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メジ ヤー ^e	HWE P ^f	マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メジ ヤー ^e	HWE P ^f
rs7944761	1361414	C/T	137	435	294	0.29	385	942	555	0.71
rs4752744	1674842	G/A	10	141	724	0.31	8	272	1605	0.41
rs11036021	40668015	T/G	218	429	228	0.59	435	915	539	0.23
rs2736601	61462097	A/G	4	124	745	0.81	16	251	1618	0.09
rs2727267	61462692	A/G	5	111	684	0.80	17	223	1532	0.01
染色体 12										
rs12310569	6567614	A/G	25	236	606	0.71	48	477	1355	0.42
rs10845459	12099918	G/A	224	446	205	0.59	443	954	488	0.61
染色体 13										
rs1278769	112584628	A/G	38	278	551	0.68	119	666	1096	0.19
染色体 14										
rs12879458	45894992	T/C	19	261	591	0.12	45	494	1346	1.00
rs10139381	46152755	C/T	56	330	478	1.00	142	754	975	0.86
rs2781413	97038740	C/T	60	337	475	1.00	144	741	997	0.69
染色体 15										
rs1007177	38439130	T/C	75	356	444	0.74	188	861	835	0.13
rs1992272	38446262	A/G	77	355	439	0.68	189	854	834	0.17
rs2289332	38471072	C/T	121	399	338	0.88	286	928	634	0.08
rs10518693	38487314	T/C	182	396	263	0.16	297	907	631	0.36
rs2034650	38504594	C/T	179	378	317	<0.01	422	933	533	0.75
rs1849210	52413032	C/T	36	278	549	0.92	89	615	1142	0.58
rs351219	72276260	C/T	133	417	325	1.00	268	845	775	0.12
rs6496932	83626571	A/C	34	271	569	0.83	58	606	1221	0.10
rs1828481	83641916	C/A	151	397	328	0.11	292	915	681	0.63
rs7172789	83644521	C/T	147	393	332	0.10	291	912	680	0.63
rs11858744	83684068	T/C	149	393	330	0.09	287	914	684	0.53
rs16977252	83727844	G/A	78	310	488	0.01	135	689	1057	0.13
rs6496044	83868310	G/A	130	378	365	0.05	214	831	834	0.76
rs10520597	83971259	A/G	116	358	399	0.02	202	805	871	0.43
rs11633855	96054298	C/T	107	364	401	0.09	209	889	783	0.08
rs1441479	96057306	C/T	103	360	410	0.09	211	878	790	0.17
染色体 16										
rs17139255	6047175	G/T	26	251	587	1.00	49	555	1266	0.23
rs1548857	6576606	A/C	13	103	759	<0.01	10	233	1647	0.58
rs4843650	86240987	G/A	142	436	291	0.33	333	911	643	0.74
染色体 17										
rs393152	41074926	G/A	35	259	579	0.38	79	672	1132	0.11

10

20

30

40

染色体 SNP	位置 ^a	対立 遺伝子 ^b	症例				対照			
			マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メ ジ ャー ^e	HWE P ^f	マイ ナー ^c	ヘ テ ロ ^d	メ ジ ャー ^e	HWE P ^f
rs417968	41084159	C/T	47	308	494	1.00	107	731	1012	0.10
rs7215239	41123556	C/T	40	290	546	0.84	97	719	1071	0.10
rs12373139	41279910	A/G	26	233	617	0.46	81	668	1137	0.18
rs17690703	41281077	T/C	40	276	559	0.41	108	737	1040	0.14
rs17563986	41347100	G/A	26	233	617	0.46	82	668	1138	0.20
rs1981997	41412603	A/G	25	235	615	0.62	81	668	1134	0.18
rs8070723	41436901	G/A	28	240	605	0.47	85	662	1136	0.38
rs7225002	41544850	G/A	111	377	380	0.26	309	892	680	0.56
rs2532274	41602941	C/T	28	247	594	0.72	88	688	1108	0.17
rs2532269	41605885	G/A	25	235	611	0.71	85	673	1122	0.23
rs2668692	41648797	T/C	26	235	614	0.54	82	675	1131	0.14
rs183211	42143493	A/G	37	264	535	0.52	98	643	1067	0.95
rs169201	42145386	G/A	25	218	632	0.24	69	626	1194	0.25
rs7224296	42155230	G/A	72	304	498	0.01	150	779	952	0.61
rs199533	42184098	T/C	23	221	619	0.52	68	622	1161	0.20
rs415430	42214305	G/A	25	230	619	0.53	69	641	1180	0.12
染色体 18										
rs367024	10388673	T/C	25	267	582	0.43	58	514	1310	0.36
染色体 19										
rs12610495	4668672	G/A	104	380	383	0.54	143	767	959	0.57
rs2109069	4670443	A/G	107	401	367	0.94	175	793	917	0.87
rs10417008	54895365	C/T	25	227	620	0.45	53	536	1298	0.87
rs306477	61181585	A/G	165	429	282	0.95	368	928	591	0.93
染色体 20										
rs2145275	6521455	T/C	155	378	280	0.17	291	852	618	0.96
rs6088520	32596025	T/C	181	419	268	0.49	441	910	522	0.27
rs4810223	59179191	T/G	46	306	522	0.92	91	602	1195	0.18
Chr.21										
rs2823529	16271144	C/T	25	241	609	0.81	47	490	1343	0.79
rs2830234	26754202	G/T	146	430	299	0.73	307	916	666	0.81
Chr.23										
rs7879375	79014847	A/G	1	49	223	0.49	8	184	781	0.60
rs5924874	150037033	G/A	53	128	95	0.39	183	454	341	0.15

^aNCBI Build 36に基づくゲノムの位置

^b第1に挙げた症例のマイナー対立遺伝子。

^cマイナー：マイナー対立遺伝子対象の計数

^dヘテロ：ヘテロ接合型対象の計数

^eメジャー：メジャー対立遺伝子（より頻度の高い対立遺伝子）ホモ接合型対象の計数

^fHWE適合度試験に対するP値

【表 5】

表 5 : 複製のために選択した 198 個全ての SNP についての関連性情報。複製において遺伝子型決定に成功しなかった SNP に対応する空の複製及び共同カラム

MAF : マイナー対立遺伝子頻度、組み合わせた症例及び対照群におけるマイナー対立遺伝子として定義されたマイナー対立遺伝子、OR : マイナー対立遺伝子についてのオッズ比、CI : 信頼区間

染色体 SNP	発見 GWAS				複製				共同
	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
染色体 1									
rs12128329	0.37	0.34	1.26 (1.12、 1.41)	8.81e- 05	0.33	0.35	0.87 (0.74、 1.03)	0.10	0.024
rs1995785	0.21	0.17	1.22 (1.1、 1.35)	4.05e- 05	0.21	0.20	1.04 (0.91、 1.21)	0.54	0.00021
rs6428467	0.20	0.17	1.25 (1.13、 1.39)	6.45e- 05	0.20	0.19	1.06 (0.92、 1.22)	0.43	0.0002
rs7525504	0.41	0.44	0.72 (0.62、 0.85)	6.21e- 05	0.45	0.44	0.98 (0.8、 1.2)	0.81	0.00065
rs3738383	0.20	0.22	0.46 (0.33、 0.64)	3.75e- 06					
染色体 2									
rs17247006	0.15	0.12	1.30 (1.14、 1.48)	4.76e- 05	0.12	0.13	0.96 (0.79、 1.17)	0.70	0.0019
rs10495536	0.17	0.20	0.81 (0.73、 0.9)	4.30e- 05	0.22	0.18	1.25 (1.09、 1.45)	0.0018	0.12
rs2354382	0.11	0.08	1.34 (1.17、 1.54)	4.54e- 05	0.10	0.10	1.00 (0.83、 1.22)	0.97	0.0008
rs1879219	0.32	0.36	0.84 (0.77、 0.92)	9.17e- 05	0.36	0.35	1.04 (0.93、 1.18)	0.47	0.0054
rs1369523	0.18	0.21	0.80 (0.72、 0.89)	1.31e- 05	0.20	0.19	1.05 (0.91、 1.21)	0.52	0.0014

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
rs1836676	0.18	0.21	0.80 (0.72、 0.89)	1.33e- 05	0.20	0.19	1.05 (0.91、 1.21)	0.53	0.0014
rs10174598	0.39	0.36	1.41 (1.21、 1.66)	2.74e- 05	0.38	0.39	1.11 (0.89、 1.4)	0.36	7.53e- 05
rs12469218	0.22	0.20	1.74 (1.34、 2.26)	5.06e- 05	0.21	0.20	0.96 (0.64、 1.45)	0.86	0.0013
rs7578722	0.29	0.26	1.65 (1.34、 2.04)	7.16e- 06	0.26	0.27	1.00(0.73 、 1.39)	0.95	0.00021
rs4668123	0.28	0.26	1.65 (1.34、 2.03)	7.42e- 06					
rs2302696	0.29	0.26	1.63 (1.33、 2.01)	1.02e- 05	0.27	0.27	1.04 (0.77、 1.42)	0.79	0.00017
rs11687903	0.30	0.28	1.59 (1.3、 1.94)	3.61e- 05	0.28	0.28	1.08 (0.8、 1.47)	0.60	0.00024
rs2284675	0.30	0.27	1.62 (1.32、 1.98)	1.75e- 05	0.28	0.28	1.05 (0.78、 1.43)	0.74	0.00022
rs9646792	0.44	0.42	1.33 (1.15、 1.53)	3.65e- 05	0.45	0.43	1.16 (0.94、 1.42)	0.16	2.92e- 05
rs13415895	0.21	0.18	1.21 (1.09、 1.34)	9.83e- 05	0.20	0.18	1.13 (0.97、 1.31)	0.11	3.93e- 05
染色体 3									
rs13091584	0.51	0.48	1.34 (1.17、 1.53)	3.15e- 05	0.47	0.50	0.88 (0.73、 1.06)	0.17	0.0092
rs12638703	0.18	0.15	1.29 (1.15、 1.44)	3.53e- 06	0.16	0.15	1.06 (0.9、 1.25)	0.48	2.67e- 05
rs1532898	0.33	0.28	1.20 (1.1、 1.31)	7.37e- 05	0.33	0.30	1.14 (0.99、 1.3)	0.061	1.58e- 05
rs6798211	0.14	0.17	0.79 (0.7、 0.88)	9.67e- 05	0.17	0.17	1.00 (0.86、 1.17)	0.97	0.0016
rs697954	0.47	0.51	0.86 (0.8、 0.94)	6.14e- 05	0.48	0.48	0.99 (0.88、 1.11)	0.83	0.0016

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
rs1881984	0.39	0.33	1.26 (1.16、 1.37)	3.60e- 06	0.38	0.33	1.20 (1.06、 1.36)	0.0035	4.53e- 08
rs10936599	0.30	0.24	1.30 (1.19、 1.43)	3.90e- 07	0.30	0.24	1.34 (1.17、 1.52)	1.17e- 05	2.51e- 11
rs1997392	0.32	0.26	1.30 (1.19、 1.42)	3.71e- 07	0.33	0.26	1.37 (1.21、 1.55)	1.05e- 06	3.20e- 12
rs6793295	0.32	0.26	1.30 (1.19、 1.42)	3.20e- 07	0.33	0.26	1.39 (1.23、 1.58)	2.37e- 07	8.33e- 13
rs9844738	0.23	0.27	0.82 (0.74、 0.9)	4.99e- 05	0.25	0.27	0.91 (0.8、 1.04)	0.16	3.81e- 05
染色体 4									
rs4518326	0.14	0.14	0.39 (0.23、 0.66)	7.79e- 05	0.15	0.14	1.55 (0.88、 2.7)	0.13	0.019
rs16877848	0.14	0.16	0.38 (0.23、 0.61)	2.34e- 05	0.16	0.17	0.98 (0.61、 1.58)	0.93	0.00046
rs340199	0.34	0.38	0.77 (0.69、 0.87)	3.52e- 05	0.38	0.38	0.89 (0.76、 1.06)	0.19	3.62e- 05
rs2869358	0.32	0.36	0.78 (0.69、 0.87)	3.35e- 05					
rs4488910	0.13	0.16	0.80 (0.71、 0.9)	8.68e- 05	0.15	0.15	0.96 (0.82、 1.13)	0.64	0.00051
rs6830970	0.31	0.36	0.80 (0.73、 0.87)	6.66e- 05	0.32	0.33	0.91 (0.8、 1.03)	0.12	3.23e- 05
rs2609255	0.26	0.21	1.29 (1.18、 1.42)	5.27e- 06	0.28	0.21	1.43 (1.25、 1.64)	2.56e- 07	2.20e- 11
rs10019681	0.19	0.24	0.77 (0.7、 0.85)	3.73e- 05	0.22	0.23	0.94 (0.82、 1.09)	0.42	0.00013
rs2869967	0.35	0.41	0.79 (0.73、 0.86)	7.54e- 06	0.37	0.38	0.95 (0.85、 1.08)	0.45	4.28e- 05
rs7671167	0.44	0.51	0.79 (0.73、 0.85)	7.59e- 07	0.46	0.48	0.89 (0.79、 1.0)	0.06	2.96e- 07

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
rs1921679	0.29	0.33	0.82 (0.75、 0.89)	8.49e- 05	0.30	0.32	0.89 (0.79、 1.01)	0.082	2.52e- 05
rs16996143	0.29	0.33	0.81 (0.74、 0.89)	4.72e- 05	0.31	0.33	0.90 (0.79、 1.02)	0.088	1.64e- 05
rs11737182	0.29	0.33	0.81 (0.74、 0.89)	5.42e- 05	0.30	0.33	0.89 (0.79、 1.01)	0.08	1.65e- 05
rs6849143	0.36	0.41	0.81 (0.75、 0.88)	2.93e- 05	0.38	0.39	0.94 (0.83、 1.06)	0.31	6.26e- 05
rs12505696	0.40	0.35	1.25 (1.15、 1.36)	5.35e- 06	0.38	0.37	1.04 (0.93、 1.18)	0.49	3.81e- 05
rs6828137	0.43	0.47	0.84 (0.77、 0.91)	4.19e- 05	0.44	0.45	0.97 (0.86、 1.09)	0.63	0.00029
rs756345	0.31	0.36	0.81 (0.74、 0.88)	5.73e- 05	0.33	0.34	0.94 (0.83、 1.07)	0.35	0.00013
rs11727778	0.23	0.20	1.24 (1.12、 1.37)	6.16e- 05	0.19	0.21	0.86 (0.74、 1.0)	0.043	0.035
rs2130910	0.47	0.51	0.76 (0.67、 0.86)	9.30e- 05					
染色体 5									
rs2736100	0.43	0.51	0.73 (0.67、 0.79)	7.60e- 14	0.43	0.50	0.74 (0.65、 0.83)	4.05e- 07	1.71e- 19
rs2853676	0.23	0.28	0.77 (0.7、 0.84)	8.93e- 07	0.23	0.26	0.84 (0.73、 0.96)	0.0088	3.31e- 08
rs30364	0.44	0.48	0.85 (0.79、 0.93)	3.80e- 05	0.48	0.47	1.06 (0.94、 1.19)	0.35	0.0047
rs9326761	0.33	0.30	1.28 (1.14、 1.44)	2.68e- 05	0.30	0.30	1.00 (0.85、 1.18)	0.98	0.00057
rs2217649	0.25	0.21	1.21 (1.1、 1.33)	7.65e- 05	0.21	0.21	0.98 (0.85、 1.14)	0.83	0.0019
rs13385	0.21	0.24	0.79 (0.7、 0.89)	6.49e- 05	0.22	0.23	0.88 (0.74、 1.04)	0.12	3.27e- 05

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
rs31874	0.27	0.30	0.78 (0.7、 0.88)	7.08e- 05	0.26	0.29	0.80 (0.68、 0.94)	0.0077	1.73e- 06
rs702390	0.41	0.45	0.74 (0.66、 0.84)	2.96e- 06	0.43	0.43	0.88 (0.74、 1.04)	0.14	3.11e- 06
rs31850	0.46	0.50	0.77 (0.67、 0.87)	8.39e- 05	0.49	0.48	0.97 (0.81、 1.17)	0.75	0.00069
rs2963163	0.07	0.09	0.72 (0.62、 0.85)	5.04e- 05	0.08	0.08	0.96 (0.77、 1.2)	0.72	0.00043
染色体 6									
rs4959432	0.08	0.06	1.34 (1.15、 1.56)	4.64e- 05	0.09	0.07	1.23 (1.0、 1.52)	0.052	8.56e- 06
rs10484325	0.19	0.16	1.27 (1.15、 1.42)	2.92e- 05	0.20	0.16	1.32 (1.13、 1.54)	0.00038	4.67e- 08
rs10484326	0.20	0.25	0.77 (0.7、 0.85)	3.41e- 07	0.21	0.24	0.82 (0.71、 0.94)	0.0038	5.45e- 09
rs2076295	0.54	0.44	1.43 (1.32、 1.55)	1.14e- 16	0.52	0.46	1.26 (1.13、 1.42)	6.28e- 05	1.08e- 19
rs3778337	0.35	0.28	1.31 (1.2、 1.43)	6.41e- 09	0.31	0.30	1.07 (0.95、 1.22)	0.28	7.91e- 08
rs2076302	0.19	0.23	0.79 (0.71、 0.87)	1.54e- 05	0.18	0.22	0.83 (0.72、 0.95)	0.0094	4.96e- 07
rs3134603	0.15	0.12	1.38 (1.21、 1.57)	4.73e- 05	0.14	0.13	1.04 (0.86、 1.26)	0.67	0.00036
rs3134943	0.16	0.13	1.37 (1.2、 1.56)	2.76e- 05	0.14	0.13	1.12 (0.93、 1.35)	0.25	4.29e- 05
rs3132946	0.15	0.12	1.38 (1.21、 1.57)	2.58e- 05	0.14	0.12	1.19 (0.98、 1.44)	0.077	8.36e- 06
rs9267992	0.16	0.13	1.37 (1.2、 1.55)	3.38e- 05	0.14	0.13	1.16 (0.96、 1.4)	0.12	1.85e- 05
rs3129860	0.17	0.13	1.37 (1.23、 1.54)	2.26e- 06					

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
rs9271366	0.17	0.13	1.35 (1.21、 1.51)	6.72e- 06					
rs6911621	0.29	0.33	0.82 (0.75、 0.89)	7.79e- 06	0.31	0.32	0.98 (0.86、 1.1)	0.70	0.00011
rs2766535	0.51	0.47	1.18 (1.09、 1.28)	8.43e- 05					
rs961918	0.31	0.27	1.22 (1.12、 1.33)	1.38e- 05	0.29	0.27	1.08 (0.95、 1.23)	0.26	2.62e- 05
rs1932103	0.11	0.09	1.31 (1.14、 1.51)	6.11e- 05	0.10	0.10	1.03 (0.84、 1.26)	0.79	0.00061
染色体 7									
rs13225346	0.49	0.44	1.23 (1.13、 1.33)	3.96e- 06	0.46	0.45	1.03 (0.92、 1.16)	0.61	4.82e- 05
rs7783715	0.41	0.37	1.43 (1.23、 1.67)	8.71e- 06	0.39	0.38	1.13(0.9 、 1.41)	0.29	2.26e- 05
rs4994763	0.42	0.39	1.38 (1.18、 1.6)	7.92e- 05	0.39	0.39	0.99 (0.8、 1.24)	0.95	0.0014
rs962060	0.18	0.16	1.28 (1.13、 1.45)	8.90e- 05	0.16	0.16	0.97 (0.81、 1.16)	0.71	0.0028
rs2283017	0.45	0.39	1.25 (1.16、 1.36)	5.87e- 07	0.42	0.39	1.12 (1.0、 1.26)	0.051	1.91e- 07
rs4727443	0.46	0.39	1.30 (1.2、 1.41)	6.72e- 09	0.42	0.40	1.11 (0.98、 1.24)	0.093	1.17e- 08
rs941289	0.33	0.29	1.20 (1.1、 1.31)	5.10e- 05	0.30	0.30	0.97 (0.86、 1.1)	0.67	0.0022
rs2261360	0.29	0.24	1.26 (1.15、 1.38)	1.02e- 06	0.25	0.25	1.02 (0.9、 1.17)	0.72	2.72e- 05
rs720547	0.26	0.22	1.28 (1.14、 1.44)	6.39e- 05	0.23	0.23	1.01 (0.85、 1.19)	0.95	0.00095
染色体 8									
rs1379326	0.29	0.26	1.78	5.74e-	0.28	0.26	1.17	0.32	9.56e-

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
			(1.45、 2.19)	09			(0.86、 1.59)		08
rs9650356	0.20	0.17	1.23 (1.11、 1.36)	7.76e- 05	0.18	0.18	0.95 (0.81、 1.1)	0.47	0.005
rs17577994	0.30	0.28	1.42 (1.17、 1.72)	5.97e- 05	0.29	0.28	1.20 (0.9、 1.59)	0.22	6.87e- 05
rs10504290	0.16	0.15	1.96 (1.41、 2.73)	8.65e- 05	0.15	0.15	0.85 (0.45、 1.6)	0.61	0.0036
rs6471845	0.35	0.39	0.77 (0.68、 0.86)	6.35e- 05	0.38	0.37	1.05 (0.89、 1.25)	0.53	0.0036
rs979564	0.22	0.19	1.23 (1.11、 1.36)	6.92e- 05	0.20	0.20	1.00 (0.87、 1.16)	0.99	0.0011
rs279968	0.48	0.46	1.35 (1.18、 1.55)	1.18e- 05	0.47	0.46	1.14 (0.93、 1.39)	0.21	1.65e- 05
rs1467044	0.42	0.46	0.84 (0.77、 0.91)	1.90e- 05	0.43	0.46	0.88 (0.78、 0.99)	0.03	2.08e- 06
rs11781657	0.42	0.46	0.84 (0.77、 0.91)	1.83e- 05					
rs9987332	0.39	0.43	0.84 (0.77、 0.91)	2.50e- 05	0.39	0.42	0.92 (0.81、 1.03)	0.14	1.72e- 05
rs7005380	0.32	0.37	0.80 (0.73、 0.87)	2.92e- 06	0.33	0.36	0.86 (0.76、 0.97)	0.015	1.71e- 07
染色体 9									
rs7022345	0.16	0.18	0.45 (0.3、 0.69)	3.54e- 05	0.17	0.18	0.96 (0.59、 1.58)	0.88	0.00054
rs2820917	0.15	0.16	0.42 (0.25、 0.68)	9.57e- 05	0.15	0.17	0.96 (0.56、 1.64)	0.87	0.001
rs10963084	0.28	0.27	1.59 (1.29、 1.95)	4.12e- 05	0.27	0.27	1.00 (0.74、 1.35)	0.99	0.00079
rs541131	0.42	0.38	1.19 (1.1、 1.29)	1.99e- 05	0.39	0.40	0.94 (0.84、 1.06)	0.32	0.0036

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
染色体 10									
rs2441727	0.07	0.05	1.35 (1.15、 1.6)	7.33e- 05	0.09	0.07	1.35 (1.1、 1.66)	0.0041	9.80e- 07
rs10997263	0.39	0.35	1.30 (1.16、 1.46)	7.92e- 05	0.35	0.36	0.93 (0.79、 1.1)	0.38	0.0066
rs10822856	0.39	0.35	1.30 (1.15、 1.46)	8.57e- 05	0.35	0.36	0.93 (0.78、 1.09)	0.37	0.0071
rs2901088	0.32	0.36	0.82 (0.75、 0.9)	3.40e- 05	0.36	0.36	0.99 (0.88、 1.12)	0.92	0.00057
rs1936606	0.32	0.36	0.82 (0.75、 0.9)	3.23e- 05	0.36	0.36	1.00 (0.88、 1.12)	0.97	0.00063
rs1936602	0.39	0.43	0.77 (0.68、 0.87)	6.25e- 05	0.44	0.43	0.97 (0.82、 1.16)	0.75	0.00055
rs2902638	0.29	0.24	1.24 (1.13、 1.36)	2.50e- 05	0.26	0.25	1.03 (0.9、 1.17)	0.71	0.00025
rs10748858	0.36	0.41	0.81 (0.74、 0.88)	1.24e- 05	0.35	0.40	0.81 (0.72、 0.91)	0.00055	2.65e- 08
rs2067832	0.45	0.50	0.80 (0.74、 0.87)	4.73e- 07	0.46	0.49	0.87 (0.77、 0.97)	0.016	3.67e- 08
rs1980653	0.45	0.50	0.80 (0.74、 0.87)	4.65e- 07	0.46	0.50	0.87 (0.77、 0.98)	0.021	5.02e- 08
rs11191865	0.45	0.51	0.80 (0.74、 0.87)	2.82e- 07	0.46	0.50	0.87 (0.77、 0.97)	0.017	2.44e- 08
rs9419958	0.11	0.14	0.75 (0.66、 0.85)	8.46e- 05					
rs9420907	0.11	0.14	0.75(0.66 、 0.85)	9.32e- 05	0.13	0.14	0.95 (0.8、 1.13)	0.58	0.00045
rs7074532	0.31	0.27	1.22 (1.12、 1.33)	6.47e- 05	0.29	0.28	1.01 (0.89、 1.15)	0.84	0.00072
rs7073827	0.33	0.29	1.22 (1.12、 1.33)	4.01e- 05	0.31	0.30	1.05 (0.93、 1.19)	0.44	0.00014

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
染色体 11									
rs10751635	0.48	0.43	1.25 (1.15、 1.35)	1.86e- 07	0.46	0.43	1.12 (1.0、 1.26)	0.049	6.97e- 08
rs2301160	0.48	0.43	1.25 (1.15、 1.35)	1.90e- 07	0.46	0.42	1.16 (1.03、 1.3)	0.013	1.24e- 08
rs7942850	0.46	0.38	1.38 (1.27、 1.5)	9.29e- 14	0.41	0.39	1.11 (0.98、 1.25)	0.093	1.71e- 12
rs2071174	0.28	0.34	0.79 (0.72、 0.86)	3.10e- 07	0.32	0.32	1.02 (0.9、 1.16)	0.75	6.40e- 05
rs7396030	0.16	0.20	0.74 (0.66、 0.82)	5.90e- 08	0.20	0.20	0.99 (0.86、 1.15)	0.92	7.10e- 06
rs7103978	0.07	0.09	0.71 (0.61、 0.83)	1.69e- 05	0.08	0.09	0.85 (0.68、 1.05)	0.12	1.07e- 05
rs7934606	0.52	0.42	1.52 (1.4、 1.65)	5.46e- 22	0.51	0.40	1.56 (1.39、 1.76)	1.49e- 13	6.87e- 34
rs6421972	0.52	0.42	1.51 (1.39、 1.64)	1.62e- 21	0.51	0.40	1.57 (1.39、 1.77)	9.94e- 14	1.44e- 33
rs7480563	0.42	0.51	0.69 (0.64、 0.75)	4.17e- 18	0.46	0.50	0.87 (0.78、 0.98)	0.018	2.95e- 17
rs4077759	0.30	0.37	0.74 (0.67、 0.8)	8.47e- 13	0.34	0.36	0.91 (0.81、 1.03)	0.14	2.14e- 11
rs6421966	0.15	0.18	0.79 (0.71、 0.89)	4.73e- 05	0.18	0.18	0.98 (0.84、 1.14)	0.77	0.00048
rs868903	0.38	0.49	0.64 (0.59、 0.7)	1.26e- 22	0.41	0.48	0.77 (0.69、 0.87)	1.49e- 05	9.18e- 26
rs2735727	0.38	0.44	0.79 (0.73、 0.86)	8.58e- 06					
rs2857476	0.44	0.50	0.78 (0.71、 0.84)	1.62e- 06	0.46	0.51	0.85 (0.76、 0.96)	0.0074	4.68e- 08
rs12417955	0.44	0.50	0.78 (0.71、 0.84)	1.48e- 06	0.46	0.50	0.85 (0.76、 0.96)	0.0076	4.46e- 08

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
rs3829223	0.43	0.49	0.78 (0.72、 0.84)	7.52e- 07	0.45	0.50	0.81 (0.72、 0.91)	0.0003	9.07e- 10
rs3793964	0.32	0.38	0.77 (0.71、 0.84)	7.77e- 07					
rs2334659	0.12	0.16	0.71 (0.63、 0.8)	4.71e- 09	0.12	0.17	0.70 (0.59、 0.84)	5.84e- 05	1.22e- 12
rs7122936	0.33	0.40	0.76 (0.69、 0.82)	3.69e- 08	0.33	0.39	0.78 (0.69、 0.88)	6.37e- 05	1.02e- 11
rs7944761	0.40	0.45	0.81 (0.74、 0.88)	3.98e- 05	0.41	0.45	0.84 (0.75、 0.95)	0.0042	5.55e- 07
rs4752744	0.10	0.07	1.36 (1.18、 1.57)	4.42e- 05	0.09	0.08	1.24 (1.01、 1.52)	0.044	6.84e- 06
rs11036021	0.52	0.48	1.20 (1.1、 1.3)	2.85e- 05	0.49	0.47	1.08 (0.96、 1.21)	0.19	2.99e- 05
rs2736601	0.08	0.06	1.37 (1.18、 1.6)	4.66e- 05	0.08	0.08	1.01 (0.81、 1.25)	0.96	0.00079
rs2727267	0.08	0.06	1.37 (1.18、 1.6)	4.21e- 05	0.08	0.07	1.04 (0.83、 1.3)	0.75	0.00042
染色体 12									
rs12310569	0.18	0.15	1.29 (1.14、 1.46)	8.70e- 05	0.16	0.15	1.13 (0.94、 1.35)	0.19	7.21e- 05
rs10845459	0.47	0.50	0.75 (0.65、 0.86)	5.05e- 05	0.51	0.49	1.14 (0.94、 1.38)	0.17	0.011
染色体 13									
rs1278760	0.33	0.37	0.69 (0.58、 0.83)	4.79e- 05					
rs1278769	0.20	0.24	0.79 (0.72、 0.88)	9.11e- 07	0.20	0.24	0.80 (0.7、 0.92)	0.002	6.72e- 09
染色体 14									
rs12879458	0.18	0.15	1.24 (1.11、 1.38)	6.84e- 05	0.17	0.15	1.14 (0.98、 1.34)	0.096	2.52e- 05

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
rs10139381	0.24	0.27	0.58 (0.45、 0.75)	7.43e- 05	0.26	0.28	0.82 (0.59、 1.14)	0.24	9.11e- 05
rs2781413	0.25	0.29	0.83 (0.76、 0.91)	2.91e- 05	0.26	0.27	0.95 (0.83、 1.08)	0.42	0.00011
rs1552126	0.45	0.41	1.18 (1.09、 1.28)	9.45e- 05					
染色体 15									
rs1007177	0.29	0.34	0.78 (0.71、 0.85)	5.59e- 08	0.29	0.33	0.83 (0.73、 0.94)	0.0046	1.26e- 09
rs1992272	0.29	0.35	0.78 (0.71、 0.85)	3.49e- 08	0.29	0.33	0.85 (0.75、 0.96)	0.01	2.16e- 09
rs2289332	0.38	0.42	0.84 (0.77、 0.91)	2.14e- 05	0.37	0.41	0.88 (0.78、 0.99)	0.036	2.80e- 06
rs11636361	0.38	0.43	0.83 (0.76、 0.9)	6.53e- 06					
rs10518693	0.44	0.39	1.23 (1.14、 1.33)	2.93e- 06	0.45	0.41	1.20 (1.07、 1.36)	0.0022	2.32e- 08
rs2034650	0.42	0.49	0.77 (0.71、 0.84)	1.86e- 09	0.42	0.47	0.82 (0.74、 0.93)	0.00098	9.76e- 12
rs603104	0.42	0.46	0.84 (0.77、 0.91)	8.14e- 05					
rs1849210	0.22	0.20	1.67 (1.29、 2.17)	8.65e- 05	0.20	0.21	0.84 (0.56、 1.25)	0.39	0.0068
rs351219	0.36	0.38	0.71 (0.6、 0.85)	3.91e- 05	0.39	0.37	1.10 (0.88、 1.39)	0.41	0.0039
rs6496932	0.16	0.19	0.80 (0.72、 0.89)	3.65e- 05	0.19	0.19	1.04 (0.9、 1.21)	0.58	0.0023
rs1828481	0.43	0.38	1.25(1.15 、 1.36)	1.11e- 06	0.40	0.40	1.00 (0.89、 1.13)	0.93	5.56e- 05
rs7172789	0.43	0.38	1.25 (1.15、 1.36)	1.12e- 06	0.39	0.40	0.98 (0.87、 1.11)	0.79	0.00013

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
rs11858744	0.43	0.38	1.25 (1.15、 1.36)	9.74e- 07	0.40	0.39	1.00 (0.89、 1.13)	0.98	5.97e- 05
rs16977252	0.30	0.25	1.24 (1.14、 1.36)	3.36e- 05	0.27	0.25	1.04 (0.92、 1.19)	0.50	0.00016
rs6496044	0.39	0.33	1.25 (1.15、 1.36)	1.03e- 05	0.37	0.34	1.13 (1.0、 1.27)	0.045	1.95e- 06
rs10520597	0.37	0.32	1.24 (1.14、 1.35)	3.05e- 05	0.34	0.32	1.04 (0.93、 1.18)	0.49	0.00014
rs11633855	0.38	0.35	1.38 (1.17、 1.63)	9.68e- 05	0.33	0.35	1.08 (0.84、 1.39)	0.56	0.00043
rs1441479	0.37	0.35	1.38 (1.17、 1.63)	8.39e- 05	0.32	0.35	1.02 (0.79、 1.31)	0.89	0.00099
染色体 16									
rs17139255	0.19	0.16	1.25 (1.12、 1.38)	3.45e- 05	0.18	0.17	1.02 (0.88、 1.2)	0.76	0.00037
rs1548857	0.08	0.06	1.32 (1.13、 1.54)	9.21e- 05	0.07	0.07	1.11 (0.89、 1.38)	0.35	0.00019
rs4843650	0.39	0.42	0.74 (0.63、 0.87)	8.65e- 05	0.41	0.42	0.94 (0.76、 1.18)	0.61	0.00046
染色体 17									
rs393152	0.17	0.23	0.72 (0.65、 0.8)	9.26e- 08	0.19	0.22	0.82 (0.71、 0.95)	0.0075	3.50e- 09
rs417968	0.21	0.26	0.77 (0.7、 0.85)	1.57e- 05	0.24	0.26	0.91 (0.79、 1.04)	0.16	1.50e- 05
rs1635291	0.20	0.25	0.75 (0.68、 0.83)	1.49e- 06					
rs7215239	0.19	0.25	0.75 (0.68、 0.82)	9.18e- 07	0.21	0.24	0.84 (0.73、 0.97)	0.017	6.96e- 08
rs12373139	0.17	0.22	0.71 (0.64、 0.79)	7.07e- 08	0.16	0.22	0.67 (0.58、 0.79)	4.65e- 07	2.68e- 13
rs17690703	0.21	0.26	0.78	3.42e-	0.20	0.25	0.75	4.98e-	1.04e-

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
			(0.71、 0.86)	05			(0.65、 0.86)	05	08
rs17563986	0.17	0.23	0.71 (0.64、 0.78)	3.39e- 08	0.16	0.22	0.68 (0.58、 0.79)	4.95e- 07	1.27e- 13
rs1981997	0.17	0.23	0.71 (0.64、 0.78)	2.52e- 08	0.16	0.22	0.67 (0.58、 0.79)	4.74e- 07	8.87e- 14
rs8070723	0.17	0.23	0.71 (0.64、 0.79)	3.87e- 08	0.17	0.22	0.71 (0.61、 0.83)	8.06e- 06	1.61e- 12
rs7225002	0.35	0.41	0.79 (0.72、 0.86)	7.60e- 06	0.34	0.40	0.79 (0.7、 0.89)	8.11e- 05	3.04e- 09
rs2532274	0.17	0.23	0.72 (0.65、 0.8)	1.29e- 07	0.17	0.23	0.70 (0.6、 0.81)	2.99e- 06	2.43e- 12
rs2532269	0.17	0.23	0.71 (0.64、 0.79)	9.61e- 08	0.16	0.22	0.66 (0.57、 0.77)	1.63e- 07	1.61e- 13
rs2668692	0.17	0.22	0.71 (0.64、 0.79)	1.04e- 07	0.16	0.22	0.67 (0.58、 0.78)	3.35e- 07	3.12e- 13
rs183211	0.19	0.24	0.75 (0.68、 0.83)	6.95e- 06	0.20	0.23	0.84 (0.73、 0.97)	0.019	4.96e- 07
rs169201	0.16	0.21	0.71 (0.64、 0.79)	2.33e- 07	0.15	0.20	0.70 (0.6、 0.82)	8.97e- 06	1.16e- 11
rs7224296	0.23	0.28	0.78 (0.71、 0.86)	3.48e- 05	0.26	0.29	0.87 (0.77、 0.99)	0.038	4.71e- 06
rs199533	0.16	0.21	0.72 (0.64、 0.8)	5.19e- 07	0.15	0.20	0.70 (0.59、 0.81)	6.18e- 06	1.99e- 11
rs415430	0.16	0.21	0.72 (0.65、 0.8)	7.86e- 07	0.16	0.21	0.72 (0.62、 0.84)	3.88e- 05	1.48e- 10
染色体 18									
rs367024	0.19	0.16	1.23 (1.11、 1.37)	8.30e- 05	0.18	0.17	1.09 (0.94、 1.27)	0.26	0.00011
染色体 19									
rs12610495	0.34	0.29	1.29 (1.18、	9.57e- 09	0.34	0.28	1.30 (1.15、	3.94e- 05	1.68e- 12

10

20

30

40

	発見 GWAS				複製				共同
染色体 SNP	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	MAF 症例	MAF 対照	OR (95% CI)	P 値	P 値
			1.41)				1.47)		
rs2109069	0.36	0.31	1.28 (1.18、 1.4)	1.22e- 08	0.35	0.30	1.25 (1.1、 1.41)	0.00045	2.42e- 11
rs10417008	0.16	0.19	0.79 (0.71、 0.88)	1.92e- 05	0.16	0.17	0.93 (0.8、 1.09)	0.39	6.73e- 05
rs306477	0.46	0.42	1.19 (1.1、 1.29)	5.00e- 05	0.43	0.44	0.96 0.86、 1.08)	0.51	0.0034
染色体 20									
rs2145275	0.44	0.41	1.36 (1.18、 1.57)	5.23e- 05	0.42	0.41	1.18 (0.94、 1.47)	0.15	3.43e- 05
rs6088520	0.46	0.50	0.85 (0.78、 0.92)	5.27e- 05	0.45	0.48	0.90 (0.8、 1.01)	0.067	1.31e- 05
rs4810223	0.23	0.19	1.25 (1.13、 1.38)	9.58e- 05	0.23	0.21	1.13 (0.98、 1.29)	0.089	3.08e- 05
Chr.21									
rs2823529	0.17	0.16	1.86 (1.35、 2.57)	9.90e- 05	0.17	0.16	1.13 (0.68、 1.86)	0.64	0.00055
rs2830234	0.43	0.40	1.29 (1.14、 1.46)	9.42e- 06	0.41	0.41	1.05 (0.89、 1.25)	0.57	7.87e- 05
Chr.23									
rs7879375	0.13	0.10	1.40 (1.21、 1.63)	2.68e- 05	0.11	0.10	1.05 (0.83、 1.32)	0.68	0.00025
rs3903350	0.15	0.11	1.42 (1.23、 1.63)	2.94e- 06					
rs5924874	0.44	0.40	1.19 (1.07、 1.31)	6.77e- 05	0.43	0.42	1.08 (0.94、 1.24)	0.30	0.00012

【 0 3 1 1 】

【 表 6 】

表 6 : GWAS 症例、全複製症例、及び全複製対照の部分集合からの共同遺伝子型を使用した複製において遺伝子型決定に成功した 1 8 1 個全ての SNP についての調整した関連性情報

10

20

30

40

		共同分析 ^a		共同分析 上位SNPに対して調整済み ^b		共同分析 年齢に対して調整済み ^c	
	遺伝子 ^b	OR (95% CI)	P 値	OR (95% CI)	P 値	OR (95% CI)	P 値
染色体 5p15							
rs2736100	TERT	0.75(0.677 、 0.822)	3.39e- 09	N/A	N/A	0.76(0.685 、 0.839)	7.49e- 08
染色体 6p24							
rs2076295	DSP	1.30(1.184 、 1.431)	5.33e- 08	N/A	N/A	1.29(1.170 、 1.425)	3.74e- 07
染色体 7q22							
rs4727443		1.19(1.082 、 1.315)	4.06e- 04	N/A	N/A	1.18(1.068 、 1.308)	1.25e- 03
染色体 11p15							
rs868903		0.74 (0.666、 0.810)	5.74e- 10	1.04(0.934 、 1.162)	0.46	0.75(0.681 、 0.834)	4.25e- 08
rs7934606	MUC2	1.61(1.459 、 1.778)	3.47e- 21	1.06(0.944 、 1.182)	0.34	1.57(1.413 、 1.735)	9.90e- 18
rs6421972	MUC2	1.62(1.464 、 1.784)	1.85e- 21	1.06(0.944 、 1.183)	0.34	1.57(1.415 、 1.737)	8.51e- 18
rs7480563	MUC2	0.82(0.747 、 0.906)	7.10e- 05	1.10(0.988 、 1.225)	0.08	0.85(0.772 、 0.942)	1.78e- 03
rs7942850		1.15(1.042 、 1.271)	5.63e- 03	0.94(0.846 、 1.054)	0.31	1.10(0.995 、 1.224)	0.06
rs4077759		0.87(0.782 、 0.957)	4.86e- 03	1.13(1.015 、 1.268)	0.03	0.90(0.809 、 0.998)	0.05
rs2334659		0.72(0.626 、 0.828)	3.99e- 06	0.89(0.766 、 1.034)	0.13	0.75(0.649 、 0.869)	1.21e- 04
rs7122936		0.79(0.716 、 0.877)	7.23e- 06	1.01(0.905 、 1.130)	0.85	0.80(0.719 、 0.888)	3.10e- 05
染色体 15q14-15							
rs2034650		0.84(0.765 、 0.924)	3.38e- 04	N/A	N/A	0.84(0.756 、 0.921)	3.35e- 04
rs1992272	DISP2	0.85(0.763 、 0.940)	1.83e- 03	0.93(0.804 、 1.080)	0.35	0.84(0.754 、 0.938)	1.79e- 03
染色体 17q21							
rs1981997	MAPT	0.69(0.604 、 0.776)	2.90e- 09	N/A	N/A	0.71(0.621 、 0.805)	1.63e- 07
rs17563986	MAPT	0.69(0.605 、 0.776)	2.72e- 09	0.68(0.171 、 2.704)	0.58	0.71(0.621 、 0.804)	1.37e- 07
rs8070723	MAPT	0.70(0.617 、 0.791)	1.38e- 08	1.69(0.720 、 3.939)	0.23	0.72(0.636 、 0.822)	7.63e- 07

10

20

30

40

		共同分析 ^a		共同分析 上位SNPに対して調整済み ^b		共同分析 年齢に対して調整済み ^c	
	遺伝子 ^b	OR (95% CI)	P 値	OR (95% CI)	P 値	OR (95% CI)	P 値
染色体 19p13							
rs12610495	DPP9	1.35(1.214 、 1.495)	1.99e- 08	N/A	N/A	1.32(1.185 、 1.471)	4.34e- 07
rs2109069	DPP9	1.31(1.179 、 1.446)	3.01e- 07	0.88(0.641 、 1.208)	0.43	1.28(1.154 、 1.427)	3.92e- 06
染色体 3q26							
rs1881984		1.21(1.089 、 1.335)	3.07e- 04	0.93(0.794 、 1.081)	0.33	1.17(1.052 、 1.300)	3.65e.03
rs10936599	MYNN	1.35(1.212 、 1.507)	6.29e- 08	0.94(0.708 、 1.250)	0.67	1.34(1.197 、 1.502)	3.93e- 07
rs1997392		1.37(1.231 、 1.524)	6.87e- 09	0.52(0.139 、 1.966)	0.34	1.37(1.228 、 1.532)	2.08e- 08
rs6793295	LRRC34	1.38(1.242 、 1.535)	2.32e- 09	N/A	N/A	1.38(1.238 、 1.543)	8.26e- 09
染色体 4q22							
rs2609255	FAM13A	1.32(1.179 、 1.481)	1.66e- 06	N/A	N/A	1.29(1.144 、 1.451)	2.90e- 05
染色体 5p15							
rs2853676	TERT	0.83(0.742 、 0.928)	1.05e- 03	0.94 (0.83、 1.06)	0.32	0.86(0.753 、 0.950)	4.61e- 03
染色体 6p24							
rs10484326	DSP	0.78(0.699 、 0.880)	3.60e- 05	0.90 (0.76、 1.03)	0.11	0.79(0.703 、 0.892)	1.23e- 04
染色体 10q24							
rs10748858	OBFC1	0.84(0.761 、 0.929)	6.36e- 04	0.88(0.751 、 1.040)	0.14	0.84(0.758 、 0.933)	1.04e- 03
rs2067832	OBFC1	0.86(0.781 、 0.947)	2.08e- 03	1.25(0.533 、 2.915)	0.61	0.88(0.799 、 0.976)	0.02
rs11191865	OBFC1	0.86(0.780 、 0.945)	1.80e- 03	N/A	N/A	0.88(0.798 、 0.974)	0.01
染色体 11p15							
rs2301160		1.17(1.062 、 1.288)	1.49e- 03	1.02 (0.920、 1.136)	0.68	1.13(1.025 、 1.254)	0.01
rs3829223	TOLLIP	0.78(0.706	4.14e-	1.03	0.56	0.79(0.713	3.78e-

10

20

30

40

		共同分析 ^a		共同分析 上位SNPに対して調整済み ^b		共同分析 年齢に対して調整済み ^c	
	遺伝子 ^b	OR (95% CI)	P 値	OR (95% CI)	P 値	OR (95% CI)	P 値
		、 0.858)	07	(0.927、 1.150)		、 0.872)	06
rs2857476	MUC5B	0.82(0.747 、 0.907)	7.90e- 05	1.10 (0.990、 1.228)	0.07	0.84(0.759 、 0.928)	6.27e- 04
染色体 13q34							
rs1278769	ATP11A	0.80(0.708 、 0.893)	1.06e- 04	N/A	N/A	0.78(0.695 、 0.885)	7.90e- 05
染色体 15q14-15							
rs1007177	DISP2	0.84(0.753 、 0.929)	8.26e- 04	0.93 (0.80、 1.07)	0.32	0.84(0.749 、 0.930)	1.12e- 03
rs10518693	IVD	1.14(1.037 、 1.262)	7.12e- 03	1.00 (0.87、 1.17)	0.95	1.15(1.041 、 1.276)	6.42e- 03
染色体 17q21							
rs393152	CRHR1、 C17orf69	0.77(0.683 、 0.872)	3.40e- 05	4.29(2.315 、 7.940)	3.67e- 06	0.82(0.721 、 0.930)	2.03e- 03
rs12373139	IMP5	0.69(0.604 、 0.776)	2.93e- 09	0.71(0.173 、 2.882)	0.63	0.71(0.622 、 0.806)	1.79e- 07
rs17690703		0.76(0.676 、 0.853)	3.37e- 06	1.18(0.920 、 1.506)	0.19	0.77(0.682 、 0.869)	2.20e- 05
rs2532274	KIAA1267	0.69(0.613 、 0.784)	5.68e- 09	0.90(0.553 、 1.462)	0.67	0.72(0.635 、 0.820)	5.61e- 07
rs2532269	KIAA1267	0.67(0.590 、 0.758)	2.63e- 10	0.42(0.190 、 0.938)	0.03	0.69(0.607 、 0.786)	1.99e- 08
rs2668692	KIAA1267	0.68(0.599 、 0.769)	1.13e- 09	0.37(0.127 、 1.104)	0.07	0.70(0.616 、 0.798)	7.20e- 08
rs169201	NSF	0.71(0.622 、 0.804)	1.23e- 07	1.08(0.778 、 1.507)	0.64	0.73(0.639 、 0.834)	3.48e- 06
rs199533	NSF	0.71(0.625 、 0.809)	2.31e- 07	1.09(0.792 、 1.499)	0.60	0.74(0.647 、 0.846)	1.00e- 05
rs415430	WNT3	0.72(0.633 、 0.817)	3.83e- 07	1.05(0.800 、 1.381)	0.72	0.75(0.659 、 0.858)	2.20e- 05

^a GWAS パネル及び年齢にはない rs 3 5 7 0 5 9 5 0 に対する調整を可能にするための、対照と比較した GWAS 及び複製症例の共同分析に基づく。GWAS 症例を、複製症例及び対照と同一のプラットフォームを使用し、同一の時間で、表 1 の SNP 及び rs 3 5 7 0 5 9 5 0 について再度遺伝子型決定した。

10

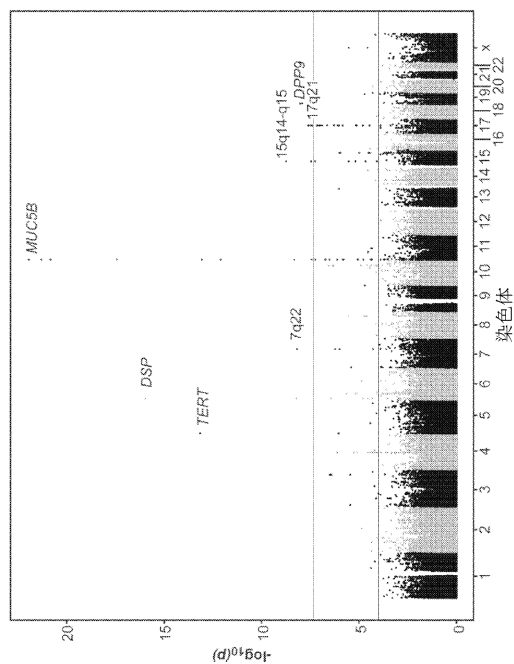
20

30

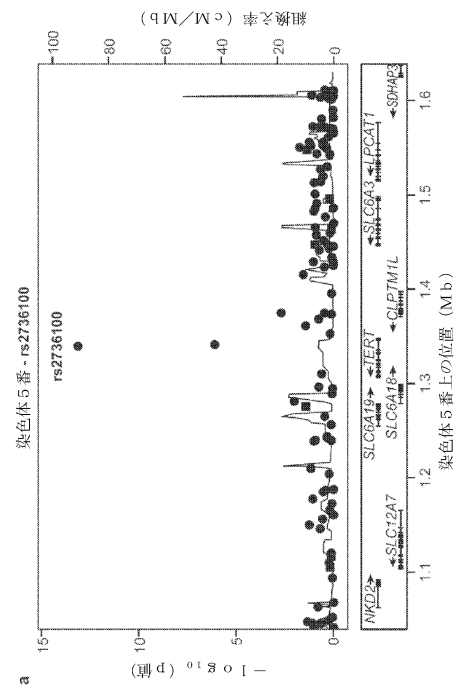
40

^b各SNPを、その遺伝子座でのメタ分析からの最も密接に関連したSNPも含んだロジスティック回帰モデルにおける関連性について試験した。各SNPをrs35705950も含んだロジスティック回帰モデルにおける関連性について試験した染色体11p15は除外する。

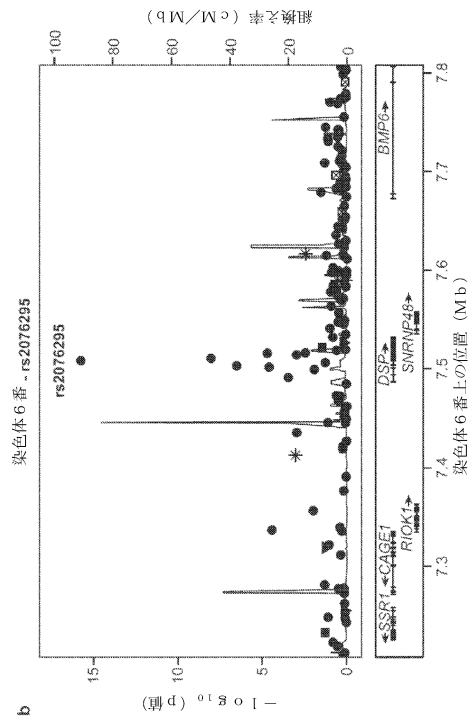
【図1】



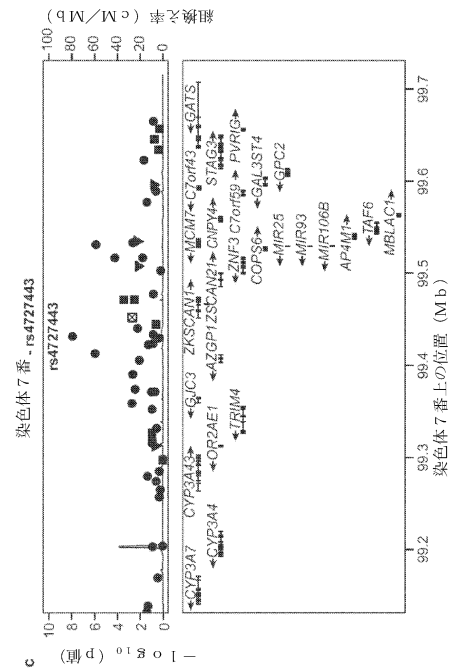
【図2-1】



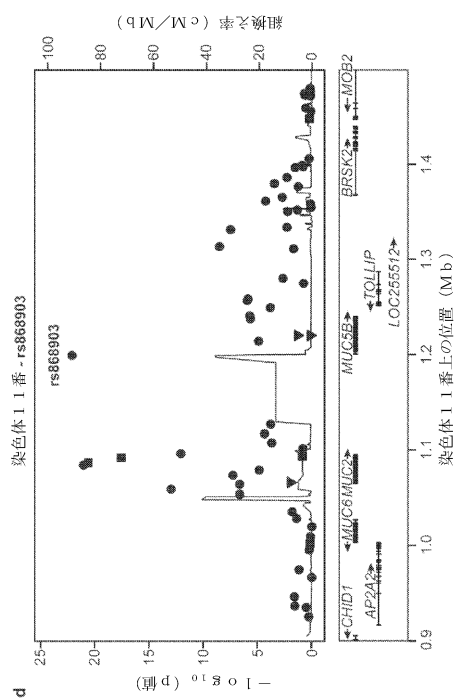
【図 2 - 2】



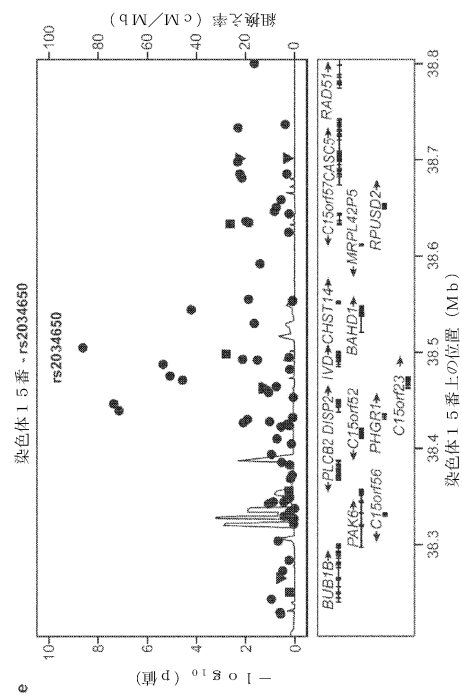
【図 2 - 3】



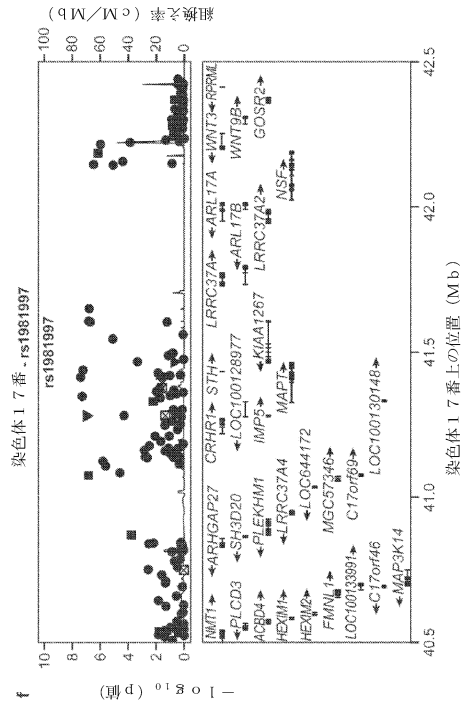
【図 2 - 4】



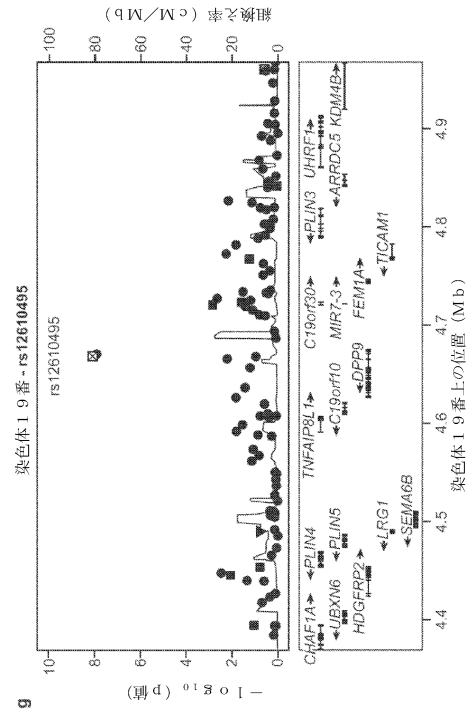
【図 2 - 5】



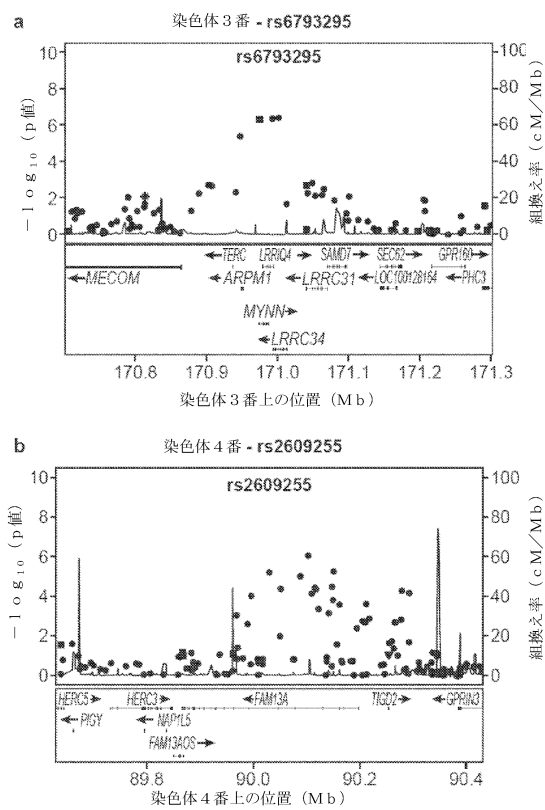
【 図 2 - 6 】



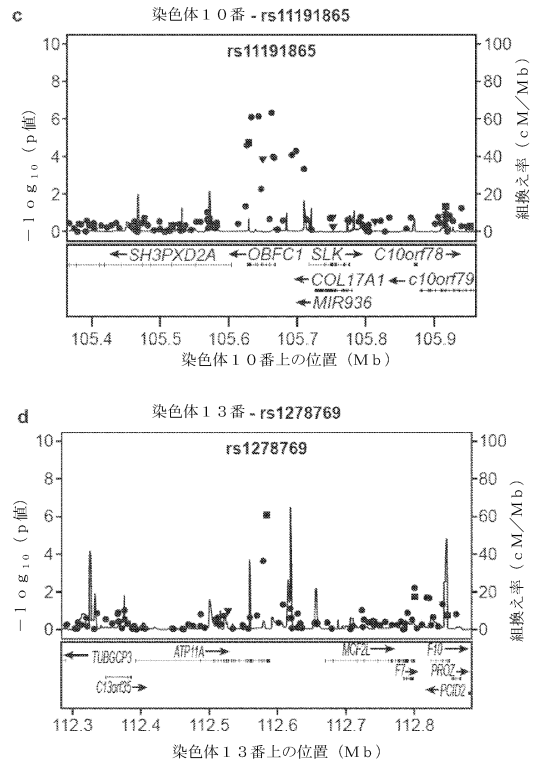
【圖 2 - 7】



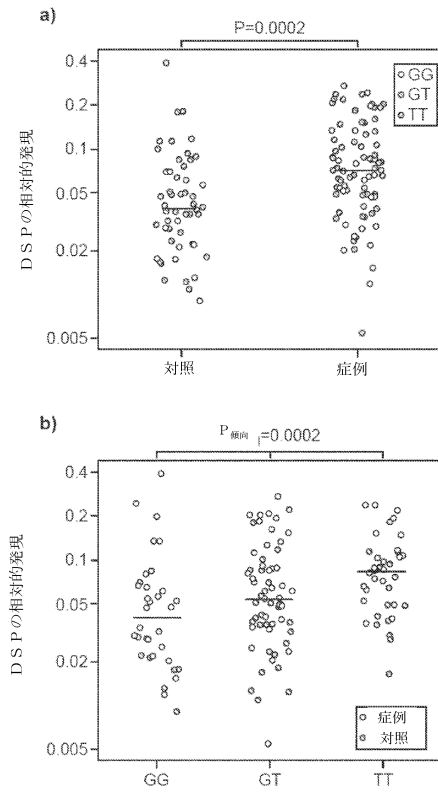
【 図 3 - 1 】



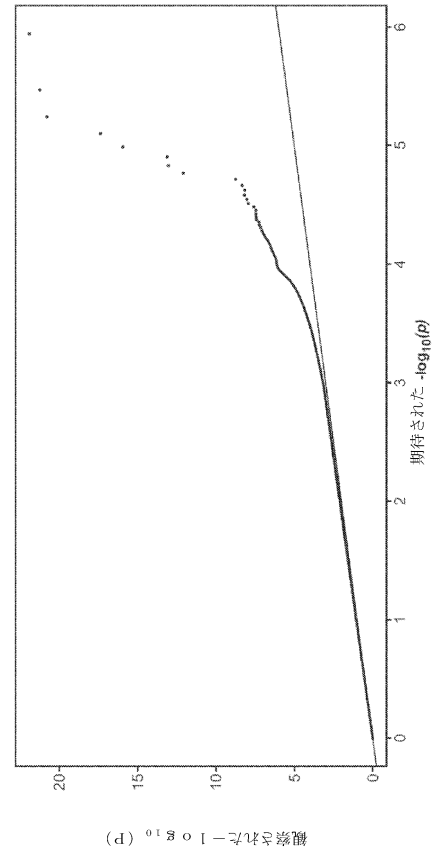
【 図 3 - 2 】



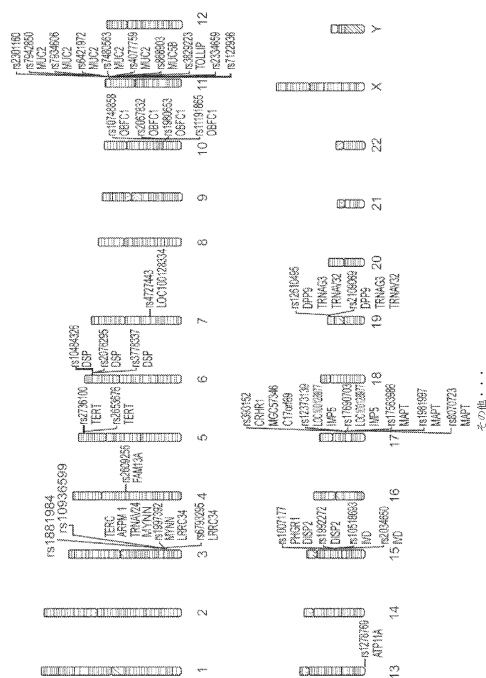
【圖 4】



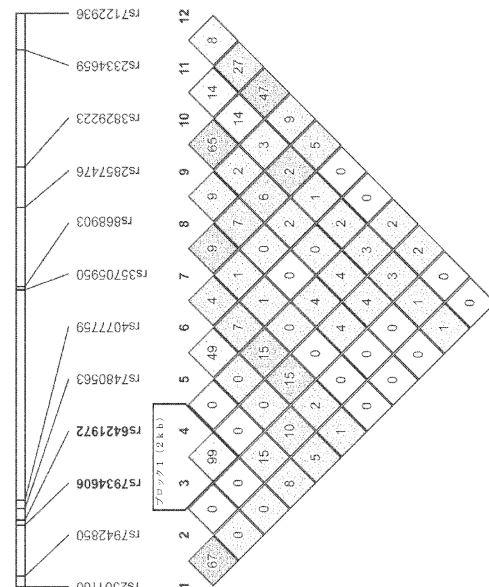
【 図 5 】



【 図 6 】



【圖 7】



【図 10】

MUC5Bプロモーター-SNP及びIPFの確認

ピッツバーグ		シカゴ		全対象	
	IPF (n=272)	対照 (n=166)	IPF (n=95)	対照 (n=367)	対照 (n=803)
マイナー-対立遺伝子 (T)	33.27%	10.84%	35.79%	11.16%	11.10%
対立遺伝子関連 (P値)	1.8×10^{-19}				
遺伝子型	8.6×10^{-14}				
GG	108 (39.7%)	132 (79.5%)	36 (37.9%)	504 (79.3%)	636 (79.3%)
GT	147 (54.0%)	32 (19.3%)	50 (52.6%)	122 (19.2%)	154 (19.2%)
TT	18 (6.3%)	2 (1.2%)	9 (9.5%)	10 (1.5%)	12 (1.5%)
遺伝子型関連 (P値)	3.9×10^{-15}				
OR (95% CI)	1.0×10^{-17}				
GT vs. GG	5.6 (3.5-8.9)				
TT vs. GG	10.4 (2.3-46.0)				
HEW (p値)	0.0003				
HEW (p値)	0.9691				
HEW (p値)	0.1572				
HEW (p値)	0.0002				
HEW (p値)	0.4472				

Naftali Kaminski及びSkip Garcia Zhang.

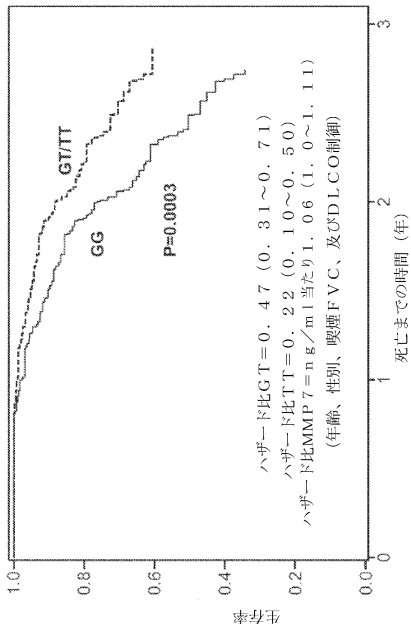
NEJM 2011; 364:1576

ストック、Thorax 2013 (近刊)

OR=4.9 (3.4-7.0); P=2.0 x 10⁻¹⁷

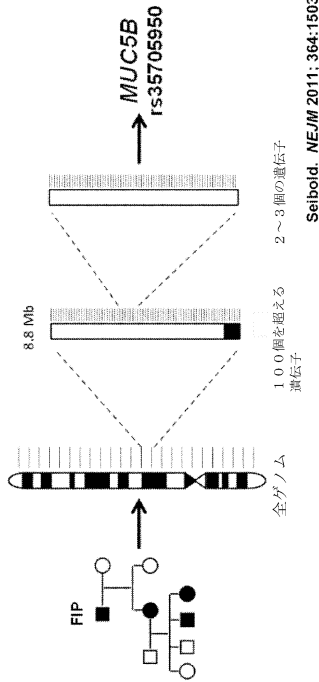
【図 11】

MUC5Bプロモーター-SNPは、改善した生存に関連付けられる
[InterMune; N=438; 74死亡]



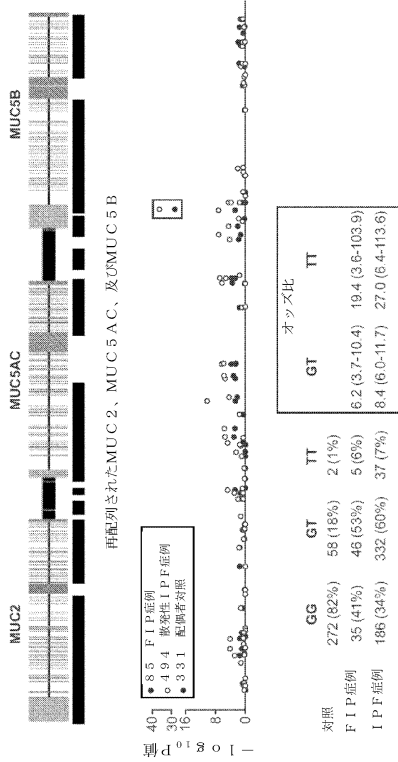
【図 8】

肺線維症における遺伝子発見
ファミリーにおけるゲノムワイド連鎖スキャン
ファイブマッピング関連研究
症例対照



【図 9】

MUC5Bプロモーター-SNP及びFIP/IPF



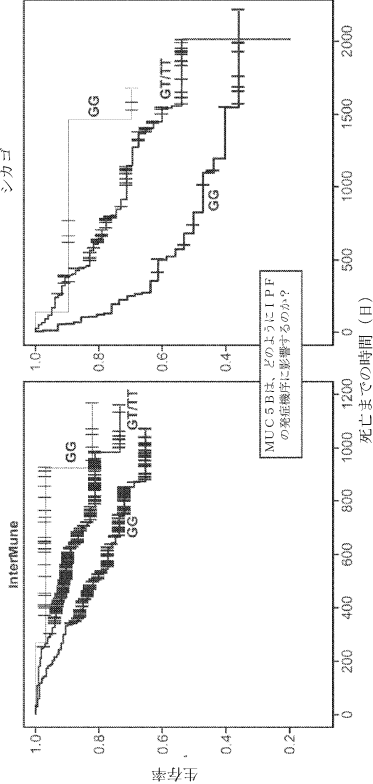
【図 1 2】

MUC5Bプロモーター-SNPは、改善した生存に関連付けられる
[InterMune (N=438) 対シカゴ (N=148)]

単変量	MUC5B	InterMune (17%死亡)		シカゴ (43%死亡)	
		HR (95% CI)	P値	HR (95% CI)	P値
	GT	0.50 (0.2-0.8)	0.001	0.49 (0.3-0.8)	0.004
	TT	0.25 (0.1-0.6)		0.24 (0.1-0.6)	

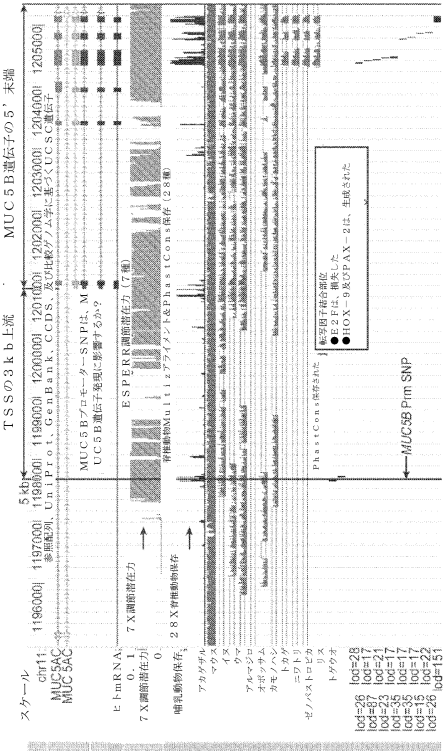
【図 1 3】

MUC5Bプロモーター-SNPは、改善した生存に関連付けられる
[InterMune (N=438) 対シカゴ (N=148)]



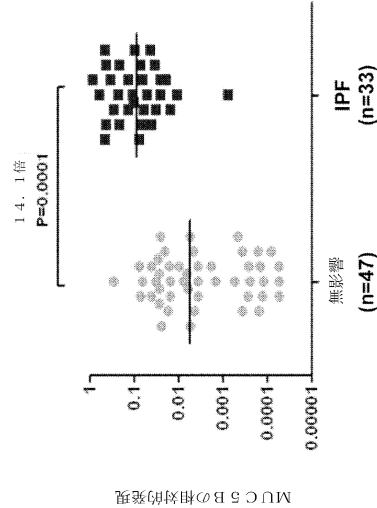
【図 1 4】

MUC5Bプロモーター-SNP及びMUC5B発現

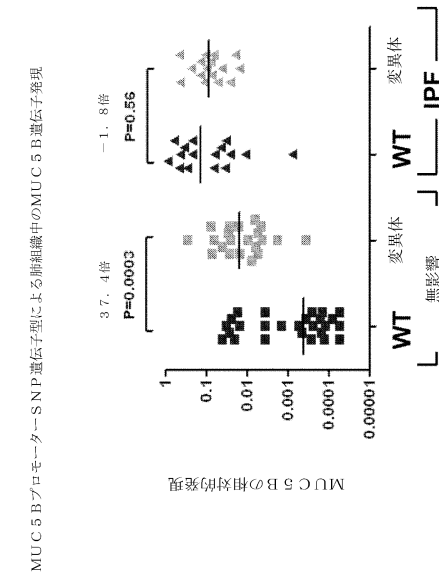


【図 1 5】

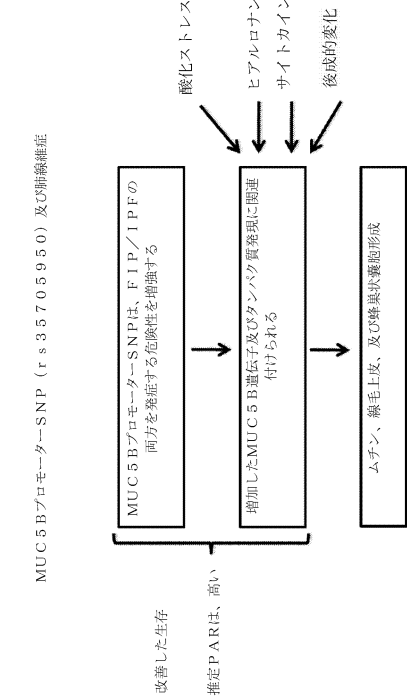
MUC5B遺伝子発現は、IPF肺組織において上方制御される



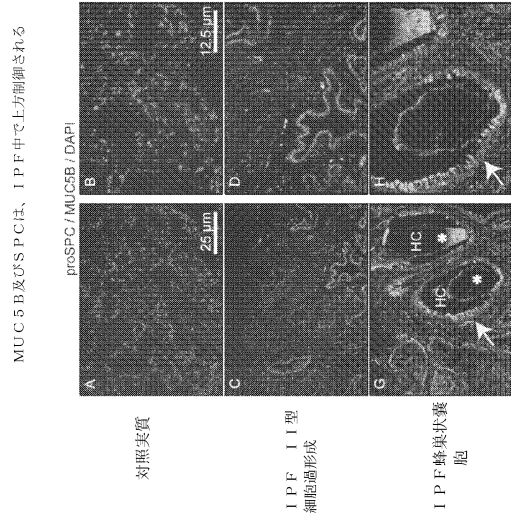
【図 16】



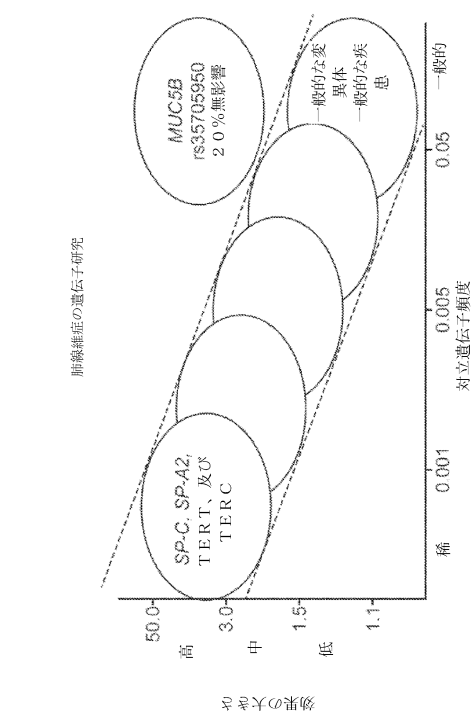
【図 18】



【図 17】

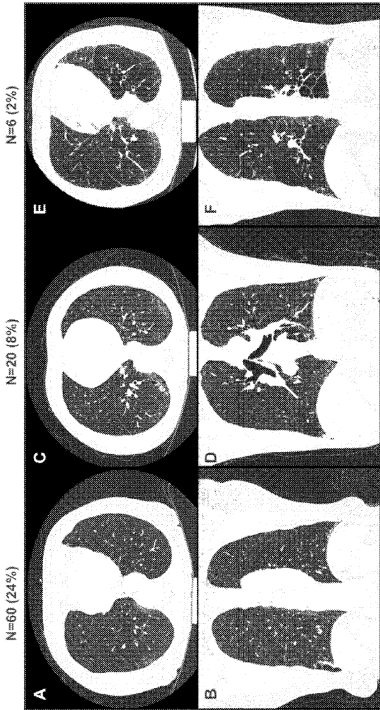


【図 19】



【図 2 0】

Framingham 集団における MUC5B プロモーター-SNP 及び肺線維症



【図 2 1】

Framingham 集団における MUC5B プロモーター-SNP 及び肺線維症

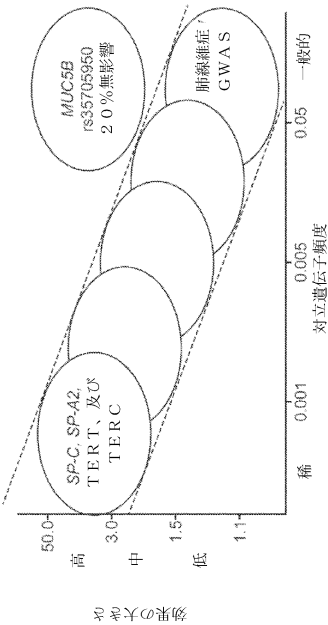
50歳を超える、N=254

高解像度胸部CTスキャン	野生型 (N=128)	ヘテロ接合体 (N=120)	ホモ接合体 (N=6)	変異体T対立遺伝子1個当たりのオッズ比 (95% CI)
間質性肺異常	16%	29%	83%	2.5 (1.4-4.4)
限局的肺線維症	4%	15%	50%	4.9 (1.7-13.8)
進行した肺線維症	<1%	4%	33%	9.0 (1.0-81.8)

- 50歳以上のほぼ5%が、肺線維症を有する
- 一般集団（バイオマーカー）において、MUC5B変異体を有する個体のほぼ15%が、肺線維症に罹患しているだろう
- MUC5B変異体は、肺線維症の放射線学的証拠の増加に関連付けられる

【図 2 2】

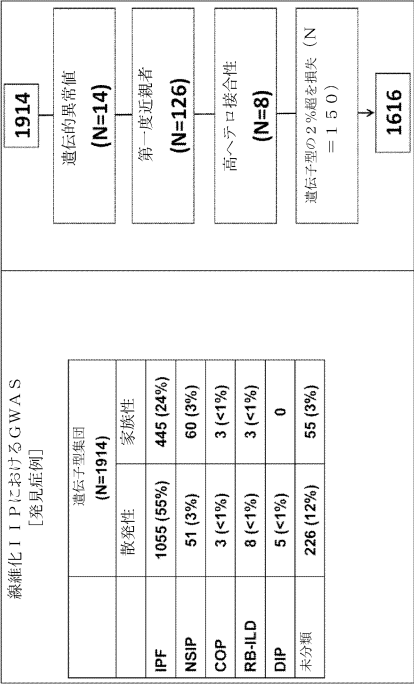
肺線維症の遺伝子研究



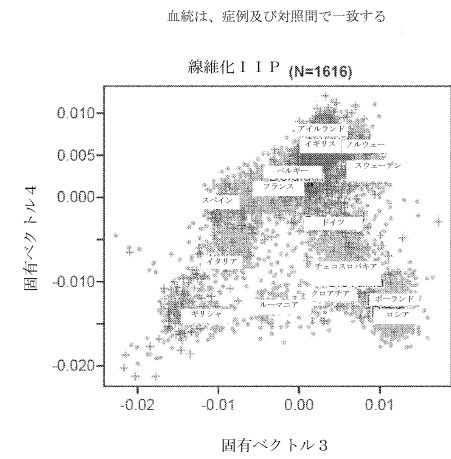
【図 2 3】

線維化 IIP における GWAS
[発見症例]

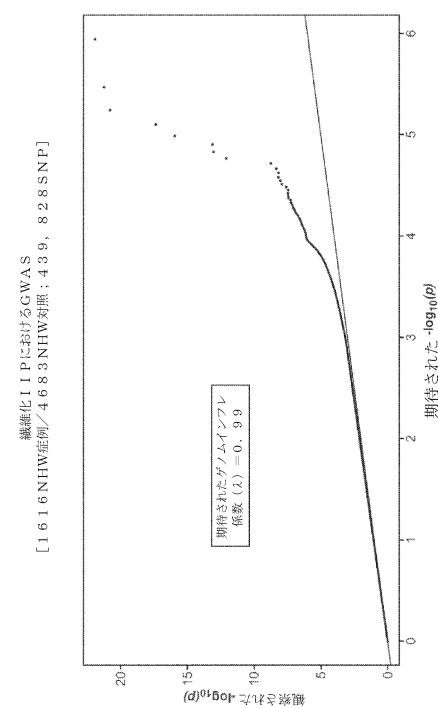
	遺伝子型集団 (N=1914)	
	散発性	家族性
IPF	1055 (55%)	445 (24%)
NSIP	51 (3%)	60 (3%)
COP	3 (<1%)	3 (<1%)
RB-ILD	8 (<1%)	3 (<1%)
DIP	5 (<1%)	0
未分類	228 (12%)	55 (3%)



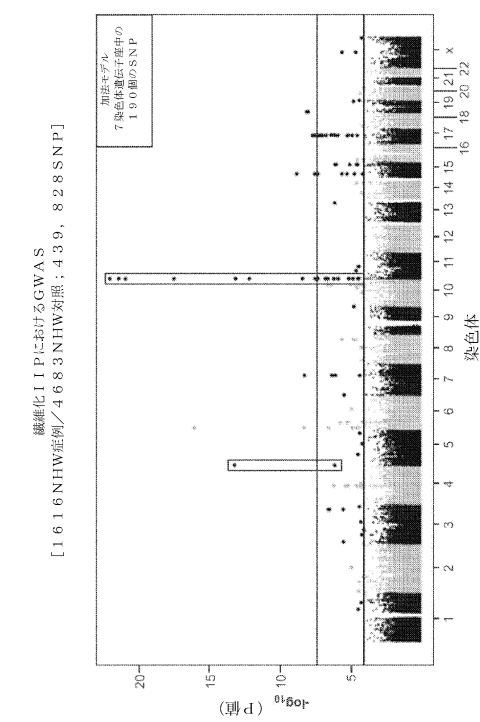
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



【図 2 7】

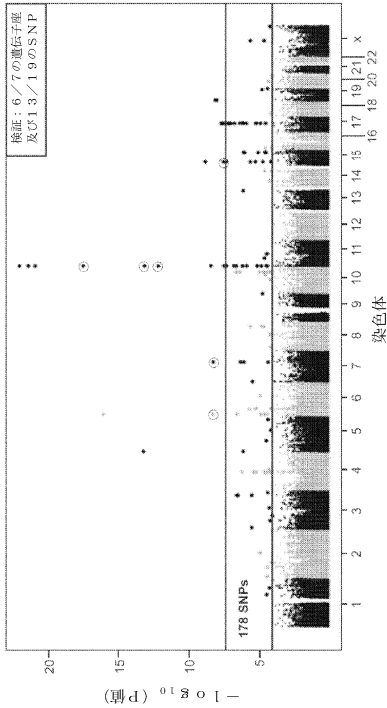
線維化 I I P における GWAS
[複製集団]

	遺伝子型集団 (N=1027)		複製集団 (N=876)	
	散発性	家族性	散発性	家族性
IPF	881 (86%)	32 (3%)	749 (86%)	25 (3%)
NSIP	66 (6%)	1 (<1%)	58 (7%)	1 (<1%)
COP	6 (1%)	0	5 (1%)	0
RB-ILD	3 (<1%)	0	2 (<1%)	0
DIP	6 (1%)	0	5 (1%)	0
未分類	31 (3%)	1 (<1%)	30 (3%)	1 (<1%)

1890 NHW 対照 - COPD 遺伝子

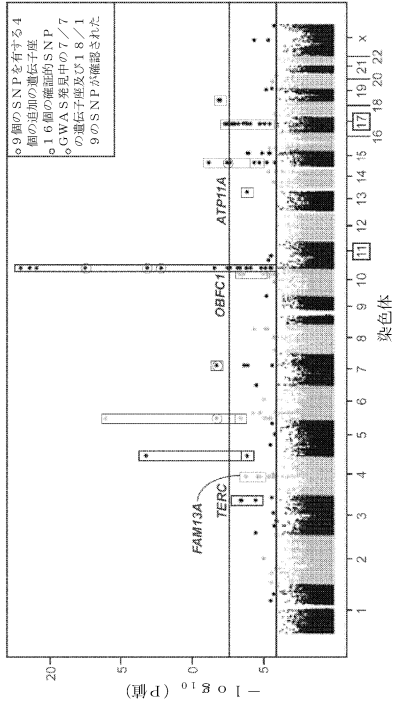
【図 28】

IIP GWASの複製
[876NHWW症例/1890NHWW対照;19SNP]



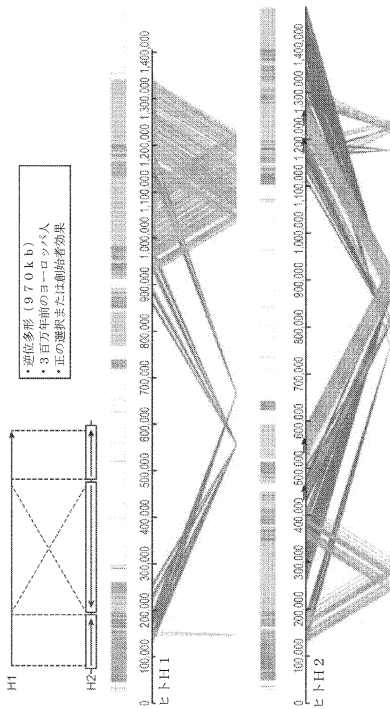
【図 29】

IIP GWASの統合
[2492NHWW症例/6573NHWW対照;197SNP]



【図 30】

染色体17q21上の血統の効果



【図 31】

染色体17q21上の血統の効果

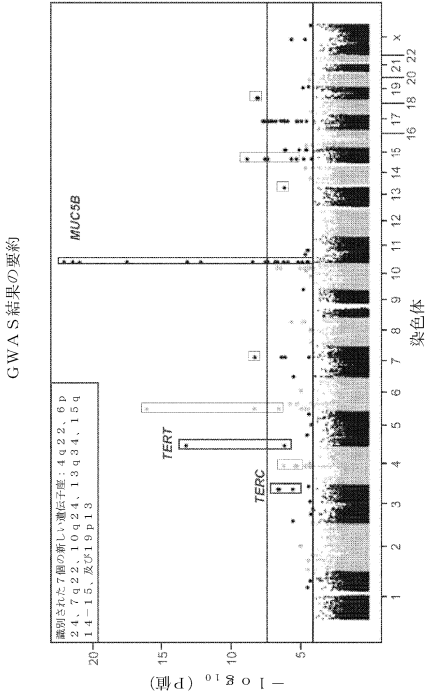
SNP	発見GWAS		複製集団		H1/H2ハプロタイプに対する測距	
	OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)	P値
rs17690703	0.78 (0.71, 0.86)	3.4×10^{-05}	0.75 (0.65, 0.86)	5.0×10^{-05}	1.23 (0.98, 1.56)	0.08
rs415430	0.72 (0.65, 0.80)	7.9×10^{-07}	0.72 (0.62, 0.84)	3.9×10^{-06}	1.17 (0.79, 1.7)	0.35
rs1981997	0.71 (0.64, 0.78)	2.5×10^{-06}	0.67 (0.58, 0.79)	4.7×10^{-07}	1.97 (0.81, 1.58)	0.46
rs2532274	0.72 (0.65, 0.80)	1.3×10^{-07}	0.70 (0.50, 0.81)	3.0×10^{-06}	1.39 (0.79, 1.12)	0.49
rs2532269	0.71 (0.64, 0.79)	9.6×10^{-08}	0.66 (0.57, 0.77)	1.6×10^{-07}	0.62 (0.79, 2.45)	0.26
rs2668692	0.71 (0.64, 0.79)	1.0×10^{-07}	0.67 (0.58, 0.78)	3.4×10^{-07}	0.39 (0.20, 1.98)	0.42
rs169201	0.71 (0.64, 0.79)	2.3×10^{-07}	0.70 (0.60, 0.82)	9.0×10^{-08}	0.39 (1.09, 1.93)	0.01
rs199533	0.72 (0.64, 0.80)	5.2×10^{-07}	0.70 (0.59, 0.81)	6.2×10^{-06}	0.44 (1.06, 1.66)	0.01

【図 3 2】

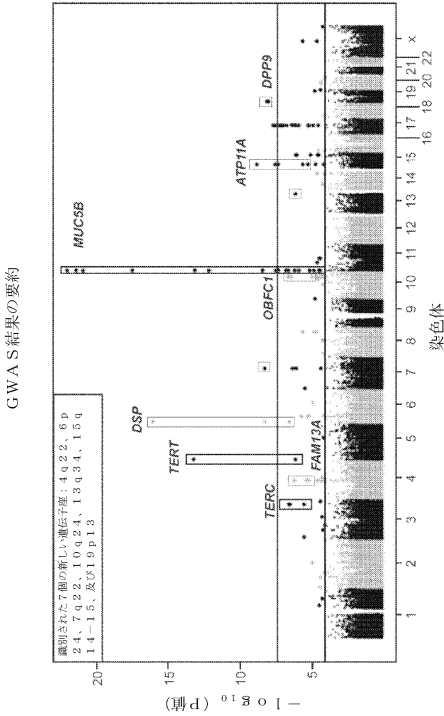
MUC5Bプロモーター-SNP (rs35705950) 及びIIP

SNP	共同分析	
	OR (95% CI)	P 値
rs35705950	4.51 (3.91, 5.21)	7.2x10 ⁻⁹⁵

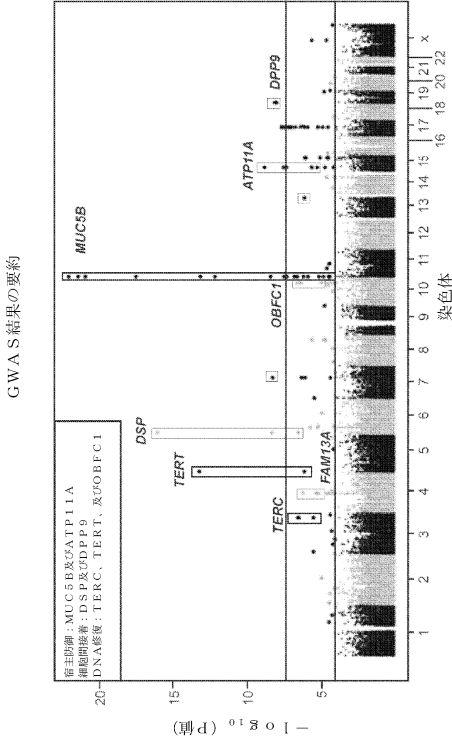
【図 3 3】



【図 3 4】



【図 3 5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/6818	(2018.01)	C 1 2 Q 1/6818 Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 0 1 P
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 M

(72)発明者 フィンガーリン, ターシャ・イー
 アメリカ合衆国、コロラド・80016、オーロラ、イースト・ケトル・ブレイス・24016

(72)発明者 ジャン, ウェイミン
 アメリカ合衆国、コロラド・80015、オーロラ、サウス・フランダース・コート・5768

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 国際公開第2011/094345(WO, A1)
 米国特許出願公開第2002/0197646(US, A1)
 Database dbSNP [online], rs2076295, 2012, [検索日:2018.01.23], URL, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2076295
 Database dbSNP [online], rs3778337, 2012, [検索日:2018.01.23], URL, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3778337
 Database dbSNP [online], rs10484326, 2012, [検索日:2018.01.23], URL, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10484326

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 Q 1 / 6 8
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)