

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年6月2日(02.06.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/114201 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
C12N 15/12 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/6813 (2018.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/686 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)

QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/043715

(22) 国際出願日: 2021年11月29日(29.11.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2020-198349 2020年11月30日(30.11.2020) JP

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

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(72) 発明者: 高田 直人(TAKADA, Naoto); 〒3213497
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王
株式会社研究所内 Tochigi (JP). 桑野 哲矢
(KUWANO, Tetsuya); 〒3213497 栃木県芳賀郡
市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内 Tochigi (JP). 井上 高良(INOUE, Takayoshi);
〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606
花王株式会社研究所内 Tochigi (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務
所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA
PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区
日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴
人形町ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

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

(54) 発明の名称: アトピー性皮膚炎の症度変化の検出方法

(57) Abstract: Provided is a method for selecting a marker for detecting changes in the severity of atopic dermatitis in a test subject. Provided is a method for detecting changes in the severity of atopic dermatitis using said marker.

(57) 要約: 被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーを選択する方法。該マーカーを用いたアトピー性皮膚炎の症度変化の検出方法。

WO 2022/114201 A1

明 細 書

発明の名称：アトピー性皮膚炎の症度変化の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、アトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカーを選択する方法、該選択方法で得られたマーカー、及び該マーカーを用いたアトピー性皮膚炎の症度変化の検出方法に関する。

背景技術

[0002] アトピー性皮膚炎（以下、「AD」とも称する）は、アトピー素因を有する者に主に発症する湿疹性皮膚疾患である。ADの典型的な症状は、左右対側性に発生する、慢性及び反復性の痒み、皮疹、紅斑等、ならびに角化不全、バリア能低下、乾燥肌などである。ADの多くは乳幼児に発症し、成長と共に軽快傾向を示すが、近年では成人型や難治性のアトピー性皮膚炎も増加している。ADでは、様々な病因が複合的に関わることにより、症状や表現型の多様性が形成され、増悪と軽快を繰り返すことが知られている（非特許文献1）。例えば、外用薬による寛解導入後に保湿を継続しない場合、14日で約4割のAD患者が、28日で約6割のAD患者が、症状の再燃を起こすことが報告されている（非特許文献2）。従って、ADを治療するにあたっては、症状や表現型の多様性も含めたADの症度を正しく把握することが必要である。

[0003] 従来のADの症度の評価方法としては、医師の肉眼による所見に基づく評価が挙げられる。所見項目としては、乾燥症状、紅斑、鱗屑、丘疹、掻破痕、浮腫、痂皮の付着、小水疱、びらん、痒疹結節など様々に存在する。これらをスコア化した指標として、Eczema Area and Severity Index (EASI) や Severity SCORing of Atopic Dermatitis (SCORAD) が存在する。また、高性能のカメラやプローブなどの機械を用いて、ADに係る症状についての客観的数値を取得する方法もある。一方、肉眼による所見や触覚を通

した自覚に基づく、患者自身によるADの評価も行われており、評価のためのスコア化した指標として、Patient Oriented Eczema Measure (POEM)、Patient Oriented SCORAD (PO-SCORAD) や Visual Analog Scaling (VAS) が存在する。

[0004] 近年、所見や自覚に現れる表現型（フェノタイプ）だけでなく、病態生物学的な機序の型（エンドタイプ）を用いてADの病態の評価を行い、最適な治療法選択の一助とすることが提唱されている。つまり、類似する表現型を呈するAD患者同士でも、それらが異なる分子機序によって引き起こされている可能性が存在する。フェノタイプとエンドタイプを合わせてAD患者の病態を細分化することで、個別の患者に適した最適治療につながると考えられつつある。現在、疾患の病態の客観的な理解、又はエンドタイプを考慮した病態の理解には、皮膚生検、血液、角層などに含まれる遺伝子またはその発現産物や、特定の細胞種の存在（これらを総称してバイオマーカーと称することもある）が用いられることが多い。従来、ADの存在の有無や症度を評価するためのバイオマーカーとしては、血液の末梢血好酸球数、血清総IgE値、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）値、血清中のThymus and Activation-Regulated Chemokine (TARC) や Squamous cell carcinoma antigen 2 (SCCA2) 等が提案されている（非特許文献3、4）。しかしそれらのバイオマーカーについて、同一個人の症度変化に伴って存在量が上下することを示すデータが十分存在するとはいえない。

[0005] 近年、生体試料中のDNAやRNA等の核酸の解析によりヒトの生体内の現在さらには将来の生理状態を調べる技術が開発されている。生体由来の核酸は、血液等の体液、分泌物、組織等から抽出することができる。さらに最近、皮膚表上脂質（skin surface lipids; SSL）に含まれるRNAを生体の解析用の試料として利用可能であることが報告されている（特許文献1）。SSLからアトピー性皮膚炎のマーカー遺伝子が検

出できることも報告されている（特許文献2）。

[0006]（特許文献1）国際公開公報第2018/008319号

（特許文献2）特開2020-074769号公報

（非特許文献1）加藤ら、日本皮膚科学会誌，2018，128:2431-2502

（非特許文献2）Lin et al., Adv Ther, 2017, 34:2601-2611

（非特許文献3）Sugawara et al., Allergy, 2002, 57:180-181

（非特許文献4）Ohta et al., Ann Clin Biochem, 2012, 49:277-284

発明の概要

[0007] 本発明は、被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーを選択する方法であって、

1) 経時的に隔てられた複数の時期での被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコアと、該複数の時期に該被験者から採取した生体試料における、下記表1に示す遺伝子又はその発現産物のいずれか1つの発現レベルに基づいて、下記P1及びP2を算出すること、

[0008] [数1]

$$P1 = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(S_{k+1} - S_k) \quad \dots (1a)$$

$$P2 = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(E_{k+1} - E_k) \quad \dots (2b)$$

ただし、 $f(x) = 1$ ($x > 0$ の場合)

$f(x) = 0$ ($x \leq 0$ の場合)

ここで、

nは、該被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコア及び生体試料を取得した回数の総数を表し、

kは、該被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコア及び生体試料の取得順を表し、

S_k は、k回目に測定した該被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコアを表し、

E_k は、k回目に採取した生体試料における該遺伝子又はその発現産物の発

現レベルを表す、

2) $P1 = P2$ となった場合に、該遺伝子又はその発現産物を、該被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーとして決定すること、

を含む、方法を提供する。

また本発明は、被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出方法であって、

被験者から採取した生体試料における、前記方法で決定したアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーの発現レベルを測定すること、

該マーカーの発現レベルの変化に基づいて、該被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化を検出すること、

を含む、方法を提供する。

また本発明は、前記検出方法に用いられる、アトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのキットを提供する。

また本発明は、下記表 1 に示す遺伝子又はその発現産物からなる、アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーを提供する。

また本発明は、下記表 1 に示す遺伝子又はその発現産物の、アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーとしての使用、又はアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーの製造における使用を提供する。

[0009]

[表1]

Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol
CLTC	DAD1	NDUFS6	CTNNBIP1
PDZD8	EMC2	NFYC	DNAJA3
CEACAM1	FAM210A	PHB	DOP1A
CRISPLD2	GBP1	RPL22	FRMPD1
EFTUD2	GHITM	RPL37A	GAN
GTF2H1	HSBP1	RPS12	GDPD3
LDHA	IGSF6	RPS4X	GJB5
NSFP1	LSM1	SLC25A3	HIP1R
PKP1	MOSPD2	SLIRP	IFFO2
PSMA1	MXD1	TBC1D9	ING4
RABGGTB	NUDC	TOMM20	KPNB1
SERPINB1	NUP58	TTC14	LRATD2
SF3B1	PDXK	UBE2K	MED31
SIGLEC5	PRDX3	ZNF791	NUAK2
STEAP4	PRKAR1A	CCDC186	PAN3
TMED10	PTPN1	NCOA2	PDCD6
TMED5	SERINC1	A2ML1	SASH1
TPMT	SRRM2	BSPRY	SCNN1G
YWHAB	TM2D1	CHAC1	SDR9C7
ZDHHC12	RPLP0	DNAJA1	SEC61A1
BNIP3L	MRPL23	FCHSD1	SERPINA9
CD1E	RPL10A	IFI27	SMIM5
DDHD1	CNKSR3	MAPK13	TINCR
MLF2	ECHS1	OSBP2	TMED7
NPC1	GPATCH2	RXRБ	TMEM123
SCNN1B	GSR	SLC22A23	TRPC4AP
KDM5D	HTATSF1	SPRR2F	TUFT1
RBM7	MPC2	ACAT2	VCP
CCDC125	MRPL42	AFTPH	ZFPL1
CDKAL1	MRPS22	CLTB	
CERS5	MRPS24	CPEB4	

発明の詳細な説明

[0010] 本明細書中で引用された全ての特許文献、非特許文献、及びその他の刊行物は、その全体が本明細書中において参考として援用される。

[0011] 本明細書において、「核酸」又は「ポリヌクレオチド」と云う用語は、DNA又はRNAを意味する。DNAには、cDNA、ゲノムDNA、及び合成DNAのいずれもが含まれ、「RNA」には、total RNA、mRNA、rRNA、tRNA、non-coding RNA及び合成のRNAのいずれもが含まれる。

[0012] 本明細書において「遺伝子」とは、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNA

の他、cDNAを含む1本鎖DNA（正鎖）、当該正鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（相補鎖）、及びこれらの断片を包含するものであって、DNAを構成する塩基の配列情報の中に、何らかの生物学的情報が含まれているものを意味する。また、本明細書における「遺伝子」には、特定の塩基配列で表される「遺伝子」だけではなく、その同族体（すなわち、ホモログもしくはオーソログ）、遺伝子多型等の変異体、及び誘導体が包含される。

[0013] 本発明において、遺伝子の「発現産物」とは、遺伝子の転写産物及び翻訳産物を包含する概念である。「転写産物」とは、遺伝子（DNA）から転写されて生じるRNAであり、「翻訳産物」とは、RNAに基づき翻訳合成される、遺伝子にコードされたタンパク質を意味する。

[0014] 本明細書において、「皮膚表上脂質（skin surface lipids；SSL）」とは、皮膚の表上に存在する脂溶性画分をいい、皮脂と呼ばれることもある。一般に、SSLは、皮膚にある皮脂腺等の外分泌腺から分泌された分泌物を主に含み、皮膚表面を覆う薄い層の形で皮膚表上に存在している。

[0015] 本明細書において、「皮膚」とは、特に限定しない限り、角層、表皮、真皮、毛包、ならびに汗腺、皮脂腺及びその他の腺などの組織を含む領域の総称である。

[0016] 本明細書において、「アトピー性皮膚炎（「AD」とも称する）」とは、増悪・寛解を繰り返す、そう痒のある湿疹を主病原とする疾患を指し、その患者の多くは、アトピー素因を持つとされている。アトピー素因としては、i）家族歴・既往歴（気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎のうちいずれか、あるいは複数の疾患）、又はii）IgE抗体を産生し易い素因、が挙げられる。

[0017] 本明細書において、アトピー性皮膚炎（AD）の「症度」とは、ADの存在の有無ではなく、ADの症状の悪さのレベルを指し、かつ軽度、中等度、重度などの大まかな分類だけでなく、より軽微な違いによる分類を含む。ADの「症度」は、例えば、AD症状を評価する公知の各種評価スコアに基づ

いて決定することができる。本明細書では、該評価スコアを「アトピー性皮膚炎（AD）の症度に係るスコア」と称する。該ADの症度に係るスコアの例としては、ADによる全身の皮疹に係るEASIスコア及びPOEMスコア、ADによる皮膚の痒みのVASスコア、ADによる皮膚乾燥のVASスコア（アトピー性皮膚炎診療ガイドライン、日本皮膚科学会刊行、日皮会誌：128（12）、2431-2502（2018））、ならびにADによる顔面部紅斑に係る紅斑インデックス（特開2018-23756号公報、及びDawson et al., Phys Med Biol, 25, 1980を参照）が挙げられ、あるいは、これらのスコア及びインデックスから選択されるいずれか2つ以上を総合的に評価して決定されたスコアを用いてもよい。「症度」として、該ADの症度に係るスコア自体をADの症状の悪さのレベルとして用いても良い。

[0018] 本明細書において、ADの症度変化の「検出」は、検査、測定、判定又は評価支援などの用語で言い換えることもできる。なお、本明細書におけるADの症度変化の「検出」、「検査」、「測定」、「判定」又は「評価」という用語は、医師によるADの症度変化の診断を含むものではない。

[0019] 本発明は、アトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカーを選択する方法、該選択方法で用いられる候補マーカー、及び該選択方法で選択された検出マーカーを用いたアトピー性皮膚炎の症度変化の検出方法を提供することに関する。

[0020] 本発明は、アトピー性皮膚炎の症度の変化を検出するための候補マーカーを提供する。該候補マーカーの中から、個々人にとって適切な、アトピー性皮膚炎の症度の変化を検出するためのマーカーを選択することができる。当該マーカーは、個別のアトピー性皮膚炎患者におけるアトピー性皮膚炎の症度の変化（例えば増悪又は軽快）を簡便に、かつ客観的に検出することを可能にする。当該マーカーを用いることで、個別のアトピー性皮膚炎患者の病態の正しい把握、及び個別の患者に適した最適治療を提供することが可能になる。

[0021] (1. アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のための候補マーカーの探索)

A Dの症度変化を検出できるバイオマーカーが求められている。A D患者の症度変化をより精密に検出することができれば、患者の病態の正しい把握、ひいては患者に適した最適治療の提供が可能になる。従来のA Dの存在の有無や症度を検出するためのマーカーは、主に、集団解析、すなわち異なる症度に属する群（例えば、罹患群と正常群、又は重症群と軽症群）間での対比に基づいて見出されてきた。しかし、これら集団解析で見出された従来のマーカーは、各群内における個人のA Dの症度の軽微な違いを反映できるものとは限らず、これらの従来のマーカーによるA Dの症度変化の検出は困難であった。

[0022] 本発明者はまず、A Dの症度変化の検出のための候補マーカーの探索を試みた。すなわち、被験者のA Dの症度に係るスコアを経時的に取得し、また該被験者における各種遺伝子の発現レベルを経時的に取得した。次いで、各被験者におけるA Dの症度に係るスコアの変化と遺伝子の発現レベルの変化との関係を調べた。その結果、個別の被験者のA Dの症度に係るスコアを経時的変化と一致して発現レベルが変化し、かつそのような発現レベルの挙動が多くの被験者に共通してみられる遺伝子が見出された。これらの遺伝子又はその発現産物を、被験者におけるA Dの症度変化の検出のための候補マーカーとした。

[0023] 具体的には、後述の実施例に示すとおり、候補マーカーの探索において、アトピー性皮膚炎を有する18名の成人を被験者とした。まず、各被験者のA Dの症度に係るスコアを2週間ごとに4回取得するとともに、該被験者における遺伝子又はその発現産物として皮膚表上脂質（SSL）中のRNA発現レベルを同様に4回測定し、該指標の経時的変化プロファイル（以下症度に係るスコアの推移パターンともいう）と該RNA発現レベルの経時的変化のプロファイル（以下、発現レベルの推移パターンともいう）を取得した。A Dの症度に係るスコアとして、A Dによる全身の皮疹に係るEASISコア及びPOEMスコア、A Dによる皮膚の痒みのVASスコア、A Dによる

皮膚乾燥のVASスコア、ならびにADによる顔面部紅斑の紅斑インデックスを用いた。次に、被験者の症度に係るスコアの推移パターンと発現レベルの推移パターンを比較し、発現レベルの推移パターンがADの症度に係るスコアの推移パターンと関係する遺伝子又はその発現産物を探索した。

[0024] AD症度に係るスコアの推移パターンは、以下の式(1)に従って表すことができる。

[0025] [数2]

$$P1_j = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(S_{j,k+1} - S_{j,k}) \quad \dots (1)$$

ただし、 $f(x) = 1(x > 0 \text{ の場合})$
 $f(x) = 0(x \leq 0 \text{ の場合})$

[0026] 式(1)中、

jは被験者IDを表す。jは1以上かつ被験者の総数以下の整数である；

nは、被験者のADの症度に係るスコアを取得した回数の総数を表す；

kは被験者のADの症度に係るスコアの取得順、すなわち、経時的に被験者からADの症度に係るスコアを取得したときに、該に係るスコアが取得された順番を表す。kは、1以上かつn-1以下の整数である；

$S_{j,k}$ はIDがjの被験者におけるk回目に取得したADの症度に係るスコアを表す。

[0027] $P1_j$ の値は、被験者ID：jの症度に係るスコアの推移パターンを表す。

$P1_j$ の値の桁数は、症度に係るスコアを取得した回数と症度の変化($f(x) = 0$ 又は 1)に依存し、 $P1_j$ の値は 2^{n-1} 通り存在し得る。例えば被験者のADの症度に係るスコアを4回取得した($n=4$)場合、 $P1_j$ は「0、1、10、11、100、101、110、111」の8通りの値のいずれかの値となる：ここで、 $P1_j=0$ は、被験者のADの症度がその取得期間中に一度も前回と比べて増悪しなかったこと($10^2 * 0 + 10^1 * 0 + 10^0 * 0$)を表し； $P1_j=111$ は、被験者のADの症度がその取得期間中に前回と比べて増悪し続けたこと($10^2 * 1 + 10^1 * 1 + 10^0 * 1$)を表す。その他の $P1_j$ の値の意味が同様に理解され得る。例えば、 $P1_j=11$ は、2回目及び3

回目を取得した症度は前回と比べて増悪したが、4回目を取得した症度は前回と比べて増悪しなかったことを表す。

[0028] 被験者における遺伝子又はその発現産物の発現レベルの推移パターンは、以下の式(2)に従って表すことができる。

[0029] [数3]

$$P2_{i,j} = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(E_{i,j,k+1} - E_{i,j,k}) \quad \dots (2)$$

ただし、 $f(x) = 1(x > 0 \text{ の場合})$
 $f(x) = 0(x \leq 0 \text{ の場合})$

[0030] 式(2)中、

iは遺伝子又はその発現産物のIDを表す。iは1以上、かつ調べた遺伝子又はその発現産物の総数以下の整数である；

jは被験者IDを表す。jは1以上かつ被験者の総数以下の整数である；

nは、遺伝子又はその発現産物の発現レベルを取得した回数、言い換えると、該遺伝子又はその発現産物が由来する生体試料を採取した回数の総数を表す；

kは、遺伝子又はその発現産物の発現レベルの取得順、言い換えると、該遺伝子又はその発現産物が由来する生体試料の取得順を表す。kは、1以上かつn-1以下の整数である；

$E_{i,j,k}$ は、ID:jの被験者からk回目に採取した生体試料におけるID:iの該遺伝子又はその発現産物の発現レベルを表す。

[0031] $P2_{i,j}$ の値は、ID:jの被験者(又はサンプル)におけるID:iの遺伝子又はその発現産物についての発現レベルの推移パターンを表す。 $P2_{i,j}$ の値の桁数は、発現レベルを取得した回数と発現レベルの変化($f(x)=0$ 又は1)に依存し、 $P2_{i,j}$ の値は 2^{n-1} 通り存在し得る。例えば被験者の遺伝子又はその発現産物の発現レベルを4回取得した($n=4$)場合、 $P2_{i,j}$ は「0、1、10、11、100、101、110、111」の8通りの値のいずれかの値となる：ここで、 $P2_{i,j}=0$ は、標的とする遺伝子又はその発現産物の発現レベルがその取得期間中に一度も前回と比べて増加を示さなかったこと(1

$0^2 * 0 + 1 0^1 * 0 + 1 0^0 * 0$) を表し; $P 2_{i,j} = 1 1 1$ は、該発現レベルがその取得期間中に前回と比べて増加を示し続けたこと ($1 0^2 * 1 + 1 0^1 * 1 + 1 0^0 * 1$) を表す。その他の $P 2_{i,j}$ の値の意味が同様に理解され得る。例えば、 $P 2_{i,j} = 1 1 1$ は、2回目及び3回目に取得した発現レベルは前回と比べて増加したが、4回目に取得した発現レベルは前回と比べて増加を示さなかったことを表す。

[0032] 上記式 (1) 及び式 (2) により、ADの症度に係るスコアの推移パターン、及び遺伝子又はその発現産物の発現レベルの推移パターンを、複数の被験者についてまとめて算出することができる。しかし、より簡易的には、個別の被験者のADの症度に係るスコアの推移パターン、及び遺伝子又はその発現産物の発現レベルの推移パターンを、それぞれ下記式 (1 a) 及び式 (2 a) に従って求めることができる。

[0033] [数4]

$$P1 = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(S_{k+1} - S_k) \quad \dots (1a)$$

ただし、 $f(x) = 1(x > 0$ の場合)
 $f(x) = 0(x \leq 0$ の場合)

$$P2_i = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(E_{i,k+1} - E_{i,k}) \quad \dots (2a)$$

ただし、 $f(x) = 1(x > 0$ の場合)
 $f(x) = 0(x \leq 0$ の場合)

[0034] 式 (1 a) における n 、 k 、及び S_k は、 j を規定しないことを除いて、上記式 (1) で定義した通りである。式 (2 a) における i 、 n 、 k 、及び $E_{i,k}$ は、 j を規定しないことを除いて、上記式 (2) で定義した通りである。以下の本明細書においては、特に説明しない限り、任意の被験者 j についての $P 1_j$ 及び $P 2_{i,j}$ は、それぞれ $P 1$ 及び $P 2_i$ として表される。

[0035] 次いで、発現レベルの推移パターンが、ADの症度に係るスコアの推移パターンと関係するか否かを決定する。ID: i の遺伝子又はその発現産物の発現レベルの推移パターン $P 2_i$ と、ADの症度に係るスコアの推移パターン $P 1$ との関係性は、以下の手順で評価することができる。

まず、帰無仮説 H_0 と対立仮説 H_1 を次のように定める：

H_0 ： P_{2_i} が取り得る 2^{n-1} 通りの値のうち、各々の値をとる確率はそれぞれ等しく $1/2^{n-1}$ である；

H_1 ： P_{2_i} が取り得る 2^{n-1} 通りの値のうち、各々の値をとる確率はそれぞれ等しく $1/2^{n-1}$ ではない、

帰無仮説が成立する場合、 P_{2_i} は等しい確率で 2^{n-1} 通りのそれぞれの値をとり、 $P_1 = P_{2_i}$ となる確率は $1/2^{n-1}$ である。例えば、ADの症度に係るスコア及び遺伝子又はその発現産物の発現レベルを4回取得した（ $n=4$ ）場合、 P_{2_i} はそれぞれ $1/8$ の確率で「0、1、10、11、100、101、110、111」の8通りの値をとり、 $P_1 = P_{2_i}$ となる確率は $1/8$ である。一方、帰無仮説が棄却される場合は対立仮説が採択され、 $P_1 = P_{2_i}$ となる確率は $1/2^{n-1}$ ではない。

[0036] 次に、被験者全員のうち、 $ID : i$ の遺伝子又はその発現産物において $P_1 = P_{2_i}$ となった被験者の数をカウントする。得られた数を、 $ID : i$ の遺伝子又はその発現産物について的一致数 m_i （ i は遺伝子又はその発現産物の ID を表す）として取得する。 $ID : i$ の遺伝子又はその発現産物において帰無仮説 H_0 （ $P_1 = P_{2_i}$ となる確率は $1/2^{n-1}$ ）が成立すると仮定した場合に被験者全員（総数と J とする）中 m_i 人で $P_1 = P_{2_i}$ となる確率 p_i （ i は遺伝子又はその発現産物の ID を表す）を、下記式（3）に従って算出する。

[0037] [数5]

$$p_i = \frac{{}_J C_{m_i} \times (2^{n-1} - 1)^{J-m_i}}{(2^{n-1})^J} \quad \dots (3)$$

[0038] 一致数 m_i が得られる確率 p_i が有意水準より低いと判断された場合、帰無仮説 H_0 は棄却され対立仮説 H_1 が採択される。これは、 $ID : i$ の遺伝子又はその発現産物の発現レベルの増加及び非増加と、ADの症度の増悪及び非増悪とが統計学的に有意な関係性を有することを示唆する。この場合、 $ID : i$

の遺伝子又はその発現産物を、被験者のADの症度の変化を検出するためのマーカーの候補として決定することができる。

後述する実施例に示すように、被験者数18名の場合、 $P_1 = P_2_i$ となった被験者数が7名以上であれば、ADの症度に係るスコアの推移パターンとID:iの遺伝子又はその発現産物の発現レベルの推移パターンは有意な関係性を有すると判断する。

[0039] 以上の手順で探索された発現レベルの推移パターンがADの症度に係るスコアの推移パターンと有意な関係性を有する遺伝子又はその発現産物は、ADの症度変化の検出のための候補マーカーとして抽出される。したがって、本発明により、ADの症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーが提供される。これらの候補マーカーの中から、個別の被験者のための、ADの症度変化の検出のためのマーカーを選択することができる。

[0040] (2. アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のための候補マーカー)

以上の手順で探索された候補マーカーは、下記表2に示す122個の遺伝子及びその発現産物である。なお表2に示す遺伝子の名称(Gene Symbol)及びGene IDは、NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/])に記載のあるOfficial Symbol及びGene IDに従う。これらの遺伝子及びその発現産物は、本願発明により提供される、アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーである。

[0041]

[表2]

Gene Symbol	Gene ID	Gene Symbol	Gene ID	Gene Symbol	Gene ID	Gene Symbol	Gene ID
CLTC	1213	DAD1	1603	NDUFS6	4726	CTNNBIP1	56998
PDZD8	118987	EMC2	9694	NFYC	4802	DNAJA3	9093
CEACAM1	634	FAM210A	125228	PHB	5245	DOP1A	23033
CRISPLD2	83716	GBP1	2633	RPL22	6146	FRMPD1	22844
EFTUD2	9343	GHITM	27069	RPL37A	6168	GAN	8139
GTF2H1	2965	HSBP1	3281	RPS12	6206	GDPD3	79153
LDHA	3939	IGSF6	10261	RPS4X	6191	GJB5	2709
NSFP1	728806	LSM1	27257	SLC25A3	5250	HIP1R	9026
PKP1	5317	MOSPD2	158747	SLIRP	81892	IFFO2	126917
PSMA1	5682	MXD1	4084	TBC1D9	23158	ING4	51147
RABGGTB	5876	NUDC	10726	TOMM20	9804	KPNB1	3837
SERPINB1	1992	NUP58	9818	TTC14	151613	LRATD2	157638
SF3B1	23451	PDXK	8566	UBE2K	3093	MED31	51003
SIGLEC5	8778	PRDX3	10935	ZNF791	163049	NUAK2	81788
STEAP4	79689	PRKAR1A	5573	CCDC186	55088	PAN3	255967
TMED10	10972	PTPN1	5770	NCOA2	10499	PDCD6	10016
TMED5	50999	SERINC1	57515	A2ML1	144568	SASH1	23328
TPMT	7172	SRRM2	23524	BSPRY	54836	SCNN1G	6340
YWHAB	7529	TM2D1	83941	CHAC1	79094	SDR9C7	121214
ZDHHC12	84885	RPLP0	6175	DNAJA1	3301	SEC61A1	29927
BNIP3L	665	MRPL23	6150	FCHSD1	89848	SERPINA9	327657
CD1E	913	RPL10A	4736	IFI27	3429	SMIM5	643008
DDHD1	80821	CNKSR3	154043	MAPK13	5603	TINCR	257000
MLF2	8079	ECHS1	1892	OSBP2	23762	TMED7	51014
NPC1	4864	GPATCH2	55105	RXRB	6257	TMEM123	114908
SCNN1B	6338	GSR	2936	SLC22A23	63027	TRPC4AP	26133
KDM5D	8284	HTATSF1	27336	SPRR2F	6705	TUFT1	7286
RBM7	10179	MPC2	25874	ACAT2	39	VCP	7415
CCDC125	202243	MRPL42	28977	AFTPH	54812	ZFPL1	7542
CDKAL1	54901	MRPS22	56945	CLTB	1212		
CERS5	91012	MRPS24	64951	CPEB4	80315		

[0042] 表2に示される遺伝子は、それ自体又はそれに由来する発現産物がAD症度変化の検出のためのマーカーとして機能する限り、NCBIに登録されているヌクレオチド配列からなるものの他、該登録されている配列と実質的に同一の配列からなるものを包含する。ここで、実質的に同一の配列とは、例えば、相同性計算アルゴリズムNCBI BLASTを用い、期待値=10;ギャップを許す;フィルタリング=ON;マッチスコア=1; mismatches score=-3の条件にて検索をした場合、当該遺伝子のヌクレオチド配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上の同一性がある配列を意味する。

[0043] 前記の候補マーカーのうち、下記表3に示す20個遺伝子及びその発現産

物（以下、表3の候補マーカーともいう）は、EAS Iスコアの変化と関係する。したがって、表3の候補マーカーは、ADによる全身の皮疹の症度の変化の検出のためのマーカーの候補であり、例えば、EAS Iスコアに対応するADの症度の変化を検出するためのマーカーの候補である。より詳細には、表3の候補マーカーは、EAS Iスコアの増加及び非増加に伴って発現レベルが増加及び非増加の推移を呈する。したがって、表3の候補マーカーは、ADによる全身の皮疹の症度の増悪及び非増悪を表すマーカーの候補であり、例えば、EAS Iスコアに対応するADの症度の増悪及び非増悪を表すマーカーの候補である。

[0044] 前記の候補マーカーのうち、下記表4に示す6個の遺伝子及びその発現産物（以下、表4の候補マーカーともいう）は、POEMスコアの変化と関係する。したがって、表4の候補マーカーは、ADによる全身の皮疹の症度の変化の検出のためのマーカーの候補であり、例えば、POEMスコアに対応するADの症度の変化を検出するためのマーカーの候補である。より詳細には、表4の候補マーカーは、POEMスコアの増加及び非増加に伴って発現レベルが増加及び非増加の推移を呈する。したがって、表4の候補マーカーは、ADによる全身の皮疹の症度の増悪及び非増悪を表すマーカーの候補であり、例えば、POEMスコアに対応するADの症度の増悪及び非増悪を表すマーカーの候補である。

[0045] 上記の候補マーカーのうち、下記表5に示す24個の遺伝子及びその発現産物（以下、表5の候補マーカーともいう）は、ADによる皮膚の痒みのVASスコアの変化と関係する。したがって、表5の候補マーカーは、ADによる皮膚の痒みの症度の変化の検出のためのマーカーの候補であり、例えば、皮膚の痒みのVASスコアに対応するADの症度の変化を検出するためのマーカーの候補である。より詳細には、表5の候補マーカーは、皮膚の痒みのVASスコアの増加及び非増加に伴って発現レベルが増加及び非増加の推移を呈する。したがって、表5の候補マーカーは、ADによる皮膚の痒みの症度の増悪及び非増悪を表すマーカーの候補であり、例えば、皮膚の痒みのV

A Sスコアに対応するA Dの症度の増悪及び非増悪を表すマーカーの候補である。

[0046] 上記の候補マーカーのうち、下記表6に示す26個の遺伝子及びその発現産物（以下、表6の候補マーカーともいう）は、A Dによる皮膚乾燥のV A Sスコアの変化と関係する。したがって、表6の候補マーカーは、A Dによる皮膚の乾燥の症度の変化の検出のためのマーカーの候補であり、例えば、皮膚乾燥のV A Sスコアに対応するA Dの症度の変化を検出するためのマーカーの候補である。より詳細には、表6の候補マーカーは、皮膚乾燥のV A Sスコアの増加及び非増加に伴って発現レベルが増加及び非増加の推移を呈する。したがって、表6の候補マーカーは、A Dによる皮膚の乾燥の症度の増悪及び非増悪を表すマーカーの候補であり、例えば、皮膚乾燥のV A Sスコアに対応するA Dの症度の増悪及び非増悪を表すマーカーの候補である。

[0047] 上記の候補マーカーのうち、下記表7に示す46個遺伝子及びその発現産物（以下、表7の候補マーカーともいう）は、A Dによる顔面部紅斑の紅斑インデックスの変化と関係する。したがって、表7の候補マーカーは、A Dによる顔面部紅斑の症度の変化の検出のためのマーカーの候補であり、例えば、顔面部紅斑の紅斑インデックスに対応するA Dの症度の変化を検出するためのマーカーの候補である。より詳細には、表7の候補マーカーは、顔面部紅斑の紅斑インデックスの増加及び非増加に伴って発現レベルが増加及び非増加の推移を呈する。したがって、表7の候補マーカーは、A Dによる顔面部紅斑の症度の増悪及び非増悪を表すマーカーの候補であり、例えば、顔面部紅斑の紅斑インデックスに対応するA Dの症度の増悪及び非増悪を表すマーカーの候補である。

[0048]

[表3]

Gene Symbol	Gene Symbol
CLTC	RABGGTB
PDZD8	SERPINB1
CEACAM1	SF3B1
CRISPLD2	SIGLEC5
EFTUD2	STEAP4
GTF2H1	TMED10
LDHA	TMED5
NSFP1	TPMT
PKP1	YWHAB
PSMA1	ZDHHC12

[0049] [表4]

Gene Symbol
BNIP3L
CD1E
DDHD1
MLF2
NPC1
SCNN1B

[0050] [表5]

Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol
KDM5D	HSBP1	PTPN1
RBM7	IGSF6	SERINC1
CCDC125	LSM1	SRRM2
CDKAL1	MOSPD2	TM2D1
CERS5	MXD1	
DAD1	NUDC	
EMC2	NUP58	
FAM210A	PDXK	
GBP1	PRDX3	
GHITM	PRKAR1A	

[0051]

[表6]

Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol
RPLP0	MRPS22	SLIRP
MRPL23	MRPS24	TBC1D9
RPL10A	NDUFS6	TOMM20
CNKSR3	NFYC	TTC14
ECHS1	PHB	UBE2K
GPATCH2	RPL22	ZNF791
GSR	RPL37A	
HTATSF1	RPS12	
MPC2	RPS4X	
MRPL42	SLC25A3	

[0052] [表7]

Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol
CCDC186	RXRB	FRMPD1	NUAK2	TMED7
NCOA2	SLC22A23	GAN	PAN3	TMEM123
A2ML1	SPRR2F	GDPD3	PDCD6	TRPC4AP
BSPRY	ACAT2	GJB5	SASH1	TUFT1
CHAC1	AFTPH	HIP1R	SCNN1G	VCP
DNAJA1	CLTB	IFFO2	SDR9C7	ZFPL1
FCHSD1	CPEB4	ING4	SEC61A1	
IFI27	CTNNBIP1	KPNB1	SERPINA9	
MAPK13	DNAJA3	LRATD2	SMIM5	
OSBP2	DOP1A	MED31	TINCR	

[0053] (3. 個別の被験者のための、アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーの選択)

本発明は、上記で探索された候補マーカーから、個別の被験者のために、ADの症度変化の検出のためのマーカーを選択する方法を提供する。具体的には、ある1人の被験者のADの症度に係るスコアの推移パターンを取得するとともに、該被験者における該候補マーカーの発現レベルの推移パターンを取得する。次いで、発現レベルの推移パターンがADの症度に係るスコアの推移パターンと一致するマーカーを選択する。選択されたマーカーは、該被験者におけるADの症度変化の検出のためのマーカーとして使用することができる。

[0054] 本発明による被験者におけるADの症度変化の検出のためのマーカーを選択する方法の具体的手順を説明する。

一実施形態において、本方法は、以下の工程：

- 1) 経時的に隔てられた複数の時期での被験者のADの症度に係るスコアと、該複数の時期に該被験者から採取した生体試料における、いずれか1つの前記候補マーカーの発現レベルに基づいて、下記P1及びP2を算出すること、
 - 2) P1 = P2となった場合に、該候補マーカーを、該被験者におけるADの症度変化の検出のためのマーカーとして決定すること、
- を含む。P1及びP2は、下記式(1a)及び式(2b)で表される。

[0055] [数6]

$$P1 = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(S_{k+1} - S_k) \quad \dots (1a)$$

$$P2 = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(E_{k+1} - E_k) \quad \dots (2b)$$

ただし、 $f(x) = 1$ ($x > 0$ の場合)

$f(x) = 0$ ($x \leq 0$ の場合)

[0056] 式(1a)におけるn、k、及び S_k は、前記定義した通りであり、式(2b)におけるn、k、及び E_k は、i及びjを規定しないことを除いて、上記式(2)で定義した通りである。すなわち、nは、該被験者の症度に係るスコア及び生体試料を取得した回数の総数を表し；kは、該被験者の症度に係るスコア及び生体試料の取得順を表し； S_k は、k回目に取得した該被験者のADの症度に係るスコアを表し； E_k は、k回目に採取した生体試料における該候補マーカーの発現レベルを表す。式(1a)におけるnと式(2b)におけるnは同じ値であり、2以上であればよく、好ましくは3以上、より好ましくは4以上、かつ好ましくは10以下、より好ましくは8以下であり得る。

[0057] 本方法における被験者は、自身用のADの症度変化の検出のためのマーカーを特定することが望まれる者である。その例としては、ADの症度変化の検出を必要とする者又は希望する者、例えば、ADを発症している者などが挙げられる。

[0058] 本方法において、被験者のADの症度に係るスコアは、経時的に隔てられ

た複数の時期に取得される。前記候補マーカの発現レベルは、経時的に隔てられた複数の時期に該被験者から採取された生体試料から取得される。したがって、取得された発現レベルは、該経時的に隔てられた複数の時期での被験者における該候補マーカの発現レベルを反映する。

[0059] したがって、一実施形態において本方法は、上記工程 1) の前に、以下の工程 a) 及び b) をさらに含み得る：

a) 経時的に隔てられた複数の時期に、被験者の AD の症度に係るスコアを取得するとともに、該被験者から生体試料を採取すること、

b) 採取された生体試料から、いずれか 1 つの前記候補マーカの発現レベルを測定すること。

[0060] 本明細書において、複数の時期が「経時的に隔てられている」とは、該複数の時期のうちの一つ一つが、その隣の時期に対して、被験者の AD の症度に係るスコアの変化が現れることが期待できる程度に時間的に離れていることを表す。被験者の AD の症度に係るスコア、及び生体試料を取得する回数は、複数（2 以上）であればよいが、好ましくは 3 以上であり、より好ましくは 4 以上である。取得回数の上限は特に限定されない。単に時間及びコストの節約の点から、取得回数は、好ましくは 10 以下、より好ましくは 8 以下であり得る。

[0061] 例えば、被験者の AD の症度に係るスコア、及び生体試料は、1 日以上、好ましくは 3 日以上、より好ましくは 1 週間以上、さらに好ましくは 1 週間以上 4 週間以下、さらに好ましくは 12 日間以上 16 日間以下の間隔を空けた複数の時期に取得され得る。あるいは、被験者の AD の症度に係るスコア、及び生体試料は、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日もしくは 14 日ごとに、又は、1 週間以上 4 週間以下に 1 回の間隔もしくは 12 日間以上 16 日間以下に 1 回の間隔で、2 回以上、好ましくは 3 回以上、より好ましくは 4 回以上、かつ好ましくは 10 回以下、より好ましくは 8 回以下繰り返して取得され得る。

[0062] 被験者の AD の症度に係るスコアには、AD 症状を検出できる任意のスコ

アを用いることができ、例えば、ADによる全身の皮疹に係るEASISコア及びPOEMスコア、ADによる皮膚の痒みのVASスコア、ADによる皮膚乾燥のVASスコア、ADによる顔面部紅斑に係る紅斑インデックス、カメラやプローブなどでの観察に基づく皮膚状態のスコア等から選択される1つ以上、あるいは、これらのスコア及びインデックスから選択されるいずれか2つ以上を総合的に評価して決定されたスコアを使用することができる。好ましくは、ADによる全身の皮疹に係るEASISコア及びPOEMスコア、ADによる皮膚の痒みのVASスコア、ADによる皮膚乾燥のVASスコア、ADによる顔面部紅斑に係る紅斑インデックスから選択される1つ以上を使用することができる。

- [0063] 本方法に用いる候補マーカーは、前述した（1. アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のための候補マーカーの探索）において説明した帰無仮説 H_0 が棄却されたものである。候補マーカーより選択される任意のものについて $P_1 = P_2$ が得られた場合、該候補マーカーの発現レベルの増加は、被験者のADの症度の増悪を表し、該候補マーカーの発現レベルの非増加は、被験者のADの症度の非増悪を表しているとみなされ、該候補マーカーを、該被験者におけるADの症度変化の検出のためのマーカー（以下、個人用マーカーともいう）として決定することができる。
- [0064] 本方法においては、前述した候補マーカーの1つ以上について、それぞれ上記の工程1）及び2）に従って、被験者におけるADの症度変化の検出のためのマーカー（個人用マーカー）として使用できるか否かを決定することができる。その場合、各々の候補マーカーについて上記工程1）及び2）を繰り返し実施してもよく、又は、各々の候補マーカーについての上記工程1）及び2）を並行して実施してもよい。
- [0065] 本方法に用いる候補マーカーは、被験者のために本方法で選択される個人用マーカーにより検出したいADの症度（言い換えると、本方法に供される被験者で検出したいADの症度）と関係するものであることが好ましい。
- [0066] 一実施形態において、本方法に用いる候補マーカーは、表3の候補マーカー

一からなる群より選択されるいずれか1つ又は2つ以上、好ましくは全部であり、かつ本方法で選択される個人用マーカ―は、ADによる全身の皮疹の症度の変化の検出のためのマーカ―、例えばEAS Iスコアに対応するADの症度の変化を検出するためのマーカ―であり、より詳細には、ADによる全身の皮疹の症度の増悪及び非増悪を表すマーカ―、例えばEAS Iスコアに対応するADの症度の増悪及び非増悪を表すマーカ―である。

一実施形態において、本方法に用いる候補マーカ―は、表4の候補マーカ―からなる群より選択されるいずれか1つ又は2つ以上、好ましくは全部であり、かつ本方法で選択される個人用マーカ―は、ADによる全身の皮疹の症度の変化の検出のためのマーカ―、例えばPOEMスコアに対応するADの症度の変化を検出するためのマーカ―であり、より詳細には、ADによる全身の皮疹の症度の増悪及び非増悪を表すマーカ―、例えばPOEMスコアに対応するADの症度の増悪及び非増悪を表すマーカ―である。

一実施形態において、本方法に用いる候補マーカ―は、表5の候補マーカ―からなる群より選択されるいずれか1つ又は2つ以上、好ましくは全部であり、かつ本方法で選択される個人用マーカ―は、ADによる皮膚の痒みの症度の変化の検出のためのマーカ―、例えば皮膚の痒みのVASスコアに対応するADの症度の変化を検出するためのマーカ―であり、より詳細には、ADによる皮膚の痒みの症度の増悪及び非増悪を表すマーカ―、例えば皮膚の痒みのVASスコアに対応するADの症度の増悪及び非増悪を表すマーカ―である。

一実施形態において、本方法に用いる候補マーカ―は、表6の候補マーカ―からなる群より選択されるいずれか1つ又は2つ以上、好ましくは全部であり、かつ本方法で選択される個人用マーカ―は、ADによる皮膚の乾燥の症度の変化の検出のためのマーカ―、例えば皮膚乾燥のVASスコアに対応するADの症度の変化を検出するためのマーカ―であり、より詳細には、ADによる皮膚の乾燥の症度の増悪及び非増悪を表すマーカ―、例えば皮膚乾燥のVASスコアに対応するADの症度の増悪及び非増悪を表すマーカ―で

ある。

一実施形態において、本方法に用いる候補マーカーは、表7の候補マーカーからなる群より選択されるいずれか1つ又は2つ以上、好ましくは全部であり、かつ本方法で選択される個人用マーカーは、ADによる顔面部紅斑の症度の変化の検出のためのマーカー、例えば顔面部紅斑の紅斑インデックスに対応するADの症度の変化を検出するためのマーカーであり、より詳細には、ADによる顔面部紅斑の症度の増悪及び非増悪を表すマーカー、例えば顔面部紅斑の紅斑インデックスに対応するADの症度の増悪及び非増悪を表すマーカーである。

一実施形態において、本方法に用いる候補マーカーは、表2の候補マーカーからなる群より選択される少なくとも1つであり、かつ本方法で選択される個人用マーカーは、ADによる全身の皮疹の症度、皮膚の痒みの症度、皮膚の乾燥の症度、又は顔面部紅斑の症度の変化の検出のためのマーカー、例えばEASISコア、POEMスコア、皮膚の痒みのVASスコア、皮膚乾燥のVASスコア、又は顔面部紅斑の紅斑インデックスに対応するADの症度の変化を検出するためのマーカーであり、より詳細には、ADによる全身の皮疹の症度、皮膚の痒みの症度、皮膚の乾燥の症度、又は顔面部紅斑の症度の増悪及び非増悪を表すマーカー、例えばEASISコア、POEMスコア、皮膚の痒みのVASスコア、皮膚乾燥のVASスコア、又は顔面部紅斑の紅斑インデックスに対応するADの症度の増悪及び非増悪を表すマーカーである。

[0067] 候補マーカーである遺伝子又はその発現産物の被験者における発現レベルは、被験者から採取した生体試料、例えば、細胞、組織（生検等）、体液（組織浸出液等の体液、血液、血液から調製された血清、血漿、等）、臓器、皮膚、尿、唾液、汗、角層、皮膚表上脂質（SSL）、便、毛髪などから常法に従って測定すればよい。生体試料からの核酸又はタンパク質の調製には、市販のキットを使用することができる。生体試料から調製される核酸の好ましい例としては、ゲノムDNA等のDNA、及びmRNA等のRNAなど

が挙げられる。

[0068] 発現レベルが測定される該遺伝子又はその発現産物の数や種類には特に制限はなく、好ましくは、採取した生体試料に含まれる、候補マーカーに該当する遺伝子又はその発現産物の発現レベルが網羅的に測定され得る。

[0069] より好ましくは、発現レベルが測定される該遺伝子又はその発現産物は、被験者のSSLから調製される核酸又はタンパク質、さらに好ましくはRNAである。SSLが採取される皮膚の部位としては、特に特定されず、頭、顔、首、体幹、手足等の身体の任意の部位の皮膚が挙げられ、皮脂の分泌が多い部位、例えば頭又は顔の皮膚が好ましく、顔の皮膚がより好ましい。また、SSLが採取される皮膚の部位は、ADが発症している皮疹部であっても、発症していない無疹部であってもいずれでもよいが、好ましくは、皮疹部又は皮疹部近傍の無疹部が好ましい。ここで皮疹部近傍とは、皮疹部に隣接する10cm以内の範囲を指す。

[0070] 被験者の皮膚からのSSLの採取には、皮膚からのSSLの回収又は除去に用いられているあらゆる手段を採用することができる。好ましくは、後述するSSL吸収性素材、SSL接着性素材、又は皮膚からSSLをこすり落とす器具を使用することができる。SSL吸収性素材又はSSL接着性素材としては、SSLに親和性を有する素材であれば特に限定されず、例えばポリプロピレン、パルプ等が挙げられる。皮膚からのSSLの採取手順のより詳細な例としては、あぶら取り紙、あぶら取りフィルム等のシート状素材へSSLを吸収させる方法、ガラス板、テープ等へSSLを接着させる方法、スパーテル、スクレイパー等によりSSLをこすり落として回収する方法、などが挙げられる。SSLの吸着性を向上させるため、脂溶性の高い溶媒を予め含ませたSSL吸収性素材を用いてもよい。一方、SSL吸収性素材は、水溶性の高い溶媒や水分を含んでいるとSSLの吸着が阻害されるため、水溶性の高い溶媒や水分の含有量が少ないことが好ましい。SSL吸収性素材は、乾燥した状態で用いることが好ましい。

[0071] 採取されたSSLは、直ちに後述の核酸又はタンパク質の抽出工程に用い

られてもよく、又は、該核酸又はタンパク質抽出工程に用いるまで保存されてもよい。保存する場合、SSLは、好ましくは低温条件で保存される。SSLの保存の温度条件は、0℃以下であればよく、好ましくは -20 ± 20 ℃ $\sim -80 \pm 20$ ℃、より好ましくは -20 ± 10 ℃ $\sim -80 \pm 10$ ℃、さらに好ましくは -20 ± 20 ℃ $\sim -40 \pm 20$ ℃、さらに好ましくは -20 ± 10 ℃ $\sim -40 \pm 10$ ℃、さらに好ましくは -20 ± 10 ℃、さらに好ましくは -20 ± 5 ℃である。SSLの保存の期間は、特に限定されないが、好ましくは12ヶ月以下、例えば6時間以上12ヶ月以下、より好ましくは6ヶ月以下、例えば1日間以上6ヶ月以下、さらに好ましくは3ヶ月以下、例えば3日間以上3ヶ月以下である。

[0072] 採取したSSLからの核酸又はタンパク質の抽出には、生体試料からの核酸又はタンパク質の抽出又は精製に通常使用される方法を使用することができる。核酸の抽出又は精製方法の例としては、フェノール/クロロホルム法、AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法、又はTRIzol (登録商標)、RNeasy (登録商標)、QIAzol (登録商標) などのカラムを用いた方法、シリカをコーティングした特殊な磁性体粒子を用いる方法、Solid Phase Reversible Immobilization磁性体粒子を用いる方法、ISOGEN等の市販のRNA抽出試薬による抽出、などが挙げられる。タンパク質の抽出又は精製には、QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) 等の市販のタンパク質抽出試薬を用いることができる。

[0073] 核酸又はタンパク質の発現レベルは、当該分野で通常用いられる核酸又はタンパク質の定量法に従って、測定することができる。測定する核酸又はタンパク質の発現レベルは、生体試料中の該核酸又はタンパク質の絶対量に基づく発現レベルであっても、他の標準物質や、全核酸又は全タンパク質の発現レベルに対する相対発現レベルであってもよい。

[0074] 例えば、核酸の発現レベルは、当該分野で通常用いられる遺伝子発現解析

の手順に従って測定すればよい。遺伝子発現解析の手法の例としては、PCR、マルチプレックスPCR、リアルタイムPCR、ハイブリダイゼーション（DNAチップ、DNAマイクロアレイ、ドットブロットハイブリダイゼーション、スロットブロットハイブリダイゼーション、ノーザンブロットハイブリダイゼーション等）、シーケンシング、クロマトグラフィーなどの核酸又はその増幅産物を定量する方法が挙げられる。核酸がRNAの場合は、RNAを逆転写によりcDNAに変換した後、上記方法で定量することが好ましい。

[0075] タンパク質の発現レベルは、当該分野で通常用いられるタンパク質定量法、例えば免疫測定法（例えば、ウェスタンブロット、ELISA、免疫染色等）、蛍光法、電気泳動、プロテインチップ、クロマトグラフィー、質量分析（例えば、LC-MS/MS、MALDI-TOF/MS）、1-ハイブリッド法（PNAS, 100:12271-12276 (2003)）、2-ハイブリッド法（Biochem Biophys Res Commun, 58:302-311 (1974)）などを用いて測定することができる。あるいは、標的の核酸又はタンパク質と相互作用する分子を測定することで、標的の核酸又はタンパク質の発現レベルを測定してもよい。核酸又はタンパク質と相互作用する分子としては、DNA、RNA、タンパク質、多糖、オリゴ糖、単糖、脂質、脂肪酸、及びこれらのリン酸化物、アルキル化物、糖付加物等、及び上記いずれかの複合体が挙げられる。

[0076] 好ましくは、SSL由来RNAの発現レベルが測定される。好ましくは、SSLから抽出したRNAを逆転写によりcDNAに変換した後、該cDNA又はその増幅産物を上記の手法で定量することで、該SSL由来RNAの発現レベルが測定される。

[0077] RNAの逆転写には、解析したい特定のRNAを標的としたプライマーを用いてもよいが、より包括的な核酸の保存及び解析のためにはランダムプライマーを用いることが好ましい。該逆転写には、一般的な逆転写酵素又は逆転写試薬キットを使用することができる。好適には、正確性及び効率性の高

い逆転写酵素又は逆転写試薬キットが用いられ、その例としては、M-MLV Reverse Transcriptase及びその改変体、あるいは市販の逆転写酵素又は逆転写試薬キット、例えばPrimeScript (登録商標) Reverse Transcriptaseシリーズ (タカラバイオ社)、SuperScript (登録商標) Reverse Transcriptaseシリーズ (Thermo Scientific社)、SuperScript (登録商標) III Reverse Transcriptase、SuperScript (登録商標) VIL0 cDNA Synthesis kit (いずれもThermo Scientific社) 等が挙げられる。

該逆転写における伸長反応では、温度を好ましくは $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $42^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは $42^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$ に調整し、一方、反応時間を好ましくは60分間以上、より好ましくは80~120分間に調整することが好ましい。

[0078] PCRを用いて核酸の発現レベルを測定する場合、必要に応じて生体試料由来のRNAをcDNAに逆転写した後、プライマーペアを用いて該生体試料由来のDNAを増幅する。PCRでは、解析したい特定のDNAを標的としたプライマーペアを用いて該特定の1種のDNAのみを増幅してもよいが、複数のプライマーペアを用いて同時に複数の特定のDNAを増幅してもよい。好ましくは、該PCRはマルチプレックスPCRである。マルチプレックスPCRは、PCR反応系に複数のプライマー対を同時に使用することで、複数の遺伝子領域を同時に増幅する方法である。マルチプレックスPCRは、市販のキット (例えば、Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit; ライフテクノロジーズジャパン株式会社等) を用いて実施することができる。

[0079] 該PCRにおけるアニーリング及び伸長反応の温度は、使用するプライマーに依存するため一概には言えないが、上記のマルチプレックスPCRキットを用いる場合、好ましくは $62^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $62^{\circ}\text{C} \pm 0.5$

℃、さらに好ましくは $62^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$ である。したがって、該PCRでは、好ましくはアニーリング及び伸長反応が1ステップで行われる。該アニーリング及び伸長反応のステップの時間は、増幅すべきDNAのサイズ等に依存して調整され得るが、好ましくは14～18分間である。該PCRにおける変性反応の条件は、増幅すべきDNAに依存して調整され得るが、好ましくは $95\sim 99^{\circ}\text{C}$ で10～60秒間である。上記のような温度及び時間での逆転写及びPCRは、一般的にPCRに使用されるサーマルサイクラーを用いて実行することができる。

[0080] 当該PCRで得られた反応産物の精製は、反応産物のサイズ分離によって行われることが好ましい。サイズ分離により、目的のPCR反応産物を、PCR反応液中に含まれるプライマーやその他の不純物から分離することができる。DNAのサイズ分離は、例えば、サイズ分離カラムや、サイズ分離チップ、サイズ分離に利用可能な磁気ビーズ等によって行うことができる。サイズ分離に利用可能な磁気ビーズの好ましい例としては、Ampure XP等のSolid Phase Reversible Immobilization (SPRI) 磁性ビーズが挙げられる。

[0081] 精製したPCR反応産物に対して、その後の定量解析を行うために必要なさらなる処理を施してもよい。例えば、DNAのシーケンシングのために、精製したPCR反応産物を、適切なバッファー溶液へと調製したり、PCR増幅されたDNAに含まれるPCRプライマー領域を切断したり、増幅されたDNAにアダプター配列をさらに付加したりしてもよい。例えば、精製したPCR反応産物をバッファー溶液へと調製し、増幅DNAに対してPCRプライマー配列の除去及びアダプターライゲーションを行い、得られた反応産物を、必要に応じて増幅して、定量解析のためのライブラリーを調製することができる。これらの操作は、例えば、SuperScript (登録商標) VIL0 cDNA Synthesis kit (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) に付属している5×VIL0 RT Reaction Mix、及びIon AmpliSeq Transcriptom

e Human Gene Expression Kit (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) に付属している 5×lon AmpliSeq HiFi Mix、及び lon AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Core Panel を用いて、各キット付属のプロトコルに従って行うことができる。

[0082] リアルタイムPCRを用いて核酸の発現レベルを測定する場合、必要に応じて生体試料由来のRNAをcDNAに逆転写した後、予め放射性同位元素 (R1)、蛍光物質等で標識しておいたプライマーを用いてPCRを行い、産生される標識二本鎖DNAを検出、定量する。

[0083] ノーザンブロットハイブリダイゼーションを用いて核酸の発現レベルを測定する場合、例えば、常法に従ってメンブレン上に生体試料由来のRNAをトランスファーし、次いでR1、蛍光物質等で標識したプローブDNAを該RNAにハイブリダイズさせる。形成された標識プローブDNAとRNAとの二重鎖から該標識に由来するシグナルを検出することにより、核酸の発現レベルを測定することができる。

[0084] DNAマイクロアレイを用いて核酸の発現レベルを測定する場合、例えば、支持体上に標的の核酸に特異的にハイブリダイズする核酸 (cDNA又はDNA) を固定化したマイクロアレイを用いる。生体試料から調製した核酸 (cDNA又はcRNA) をマイクロアレイ上に結合させ、マイクロアレイ上の標識を検出することによって、生体試料中の核酸の発現レベルを測定することができる。

前記マイクロアレイに固定化される核酸としては、ストリンジェントな条件下に標的の核酸に特異的 (すなわち、実質的に標的の核酸のみに) にハイブリダイズする核酸であればよく、標的の核酸の全配列を有する核酸であっても、部分配列からなる核酸であってもよい。該「部分配列」としては、少なくとも15~25塩基からなる核酸が挙げられる。ここでストリンジェントな条件としては、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の洗浄条件、好ましくは「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度の条

件、さらに好ましくは「0.1×SSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件を挙げることができる。ストリンジェントなハイブリダイズ条件は、例えば J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) に記載されている。

[0085] シーケンシングを用いて標的の核酸の発現レベルを測定する場合、好ましくは次世代シーケンサー（例えば Ion S5/XL システム、ライフテクノロジーズジャパン株式会社）を用いることができる。シーケンシングで作成されたリードの数（リードカウント）に基づいて、DNA 又は RNA の発現レベルを測定することができる。

[0086] シーケンシングにより複数の核酸の発現レベルを測定する場合は、上記したリードカウントを発現レベルのデータとして用いることができる。あるいは、該リードカウントにおけるサンプル間の総リード数の違いを補正した、該リードカウントの RPM (Reads per million mapped reads) 値、該 RPM 値の対数值 (\log_2 RPM 値、又は \log_2 (RPM+1) 値)、DESeq2 (Love MI et al., *Genome Biol*, 2014) を用いて補正されたカウント値 (Normalized count 値) 又はその対数值 (\log_2 (Normalized count+1) 値)、などを発現レベルのデータとして用いることができる。あるいは、発現レベルのデータとして、RNA-seq の定量値として一般的な、Fragments per kilobase of exon per million reads mapped (FPKM)、reads per kilobase of exon per million reads mapped (RPKM)、transcripts per million (TPM) などを用いることができる。

[0087] 核酸の発現レベルの測定に用いられるプローブ又はプライマーは、例えば

、標的の核酸を特異的に増幅するためのプライマー、又は標的の核酸を特異的に検出するためのプローブであり得る。ここで「特異的」とは、例えばノーザンブロット法において、実質的に標的の核酸のみが検出されること、又はPCRにおいて、実質的に標的の核酸のみが増幅されることなど、実質的に標的の核酸に由来する生成物又は検出物が生成するように核酸を認識又は検出できることを意味する。これらのプローブ又はプライマーは、標的の核酸のヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。

該プローブ又はプライマーの具体的な例としては、標的の核酸の全配列又は部分配列からなるオリゴヌクレオチド又はその相補鎖を利用することができる。該「相補鎖」とは、標的の核酸を特異的に認識する限り、完全に相補的な配列に限られず、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列であればよい。配列の同一性は、上述したNCBI BLAST等のアルゴリズムにより決定することができる。

該核酸の発現レベルの測定に用いられるプライマーの例としては、標的の核酸に対して特異的なアニーリング及び鎖伸長ができるものであって、好ましくは10塩基以上、より好ましくは15塩基以上、さらに好ましくは20塩基以上、かつ好ましくは100塩基以下、より好ましくは50塩基以下、さらに好ましくは35塩基以下の鎖長を有するものが挙げられる。

該核酸の発現レベルの測定に用いられるプローブの例としては、標的の核酸に対して特異的なハイブリダイゼーションができるものであって、好ましくは10塩基以上、より好ましくは15塩基以上、かつ好ましくは100塩基以下、より好ましくは50塩基以下、さらに好ましくは25塩基以下の鎖長を有するものが挙げられる。

該プローブ又はプライマーは、DNAあるいはRNAであることができ、合成されたものでも天然のものでもよい。ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、通常、標識したものが用いられる。

[0088] 免疫測定法を用いてタンパク質の発現レベルを測定する場合、例えば、該

標的タンパク質に対する抗体を生体試料と接触させ、該抗体に結合した標的タンパク質を定量すればよい。例えば、ウェスタンブロットでは、標的タンパク質に対する一次抗体を用いた後、RI、蛍光物質、酵素等で標識した二次抗体を用いて該一次抗体を標識し、次いで該標識由来のシグナルを測定することで標的タンパク質の発現レベルを測定することができる。標的タンパク質に対する抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。これらの抗体は、公知の方法に従って製造することができる。

[0089] (4. アトピー性皮膚炎の症度変化の検出方法)

さらに本発明は、上記3. で選択した個別の被験者におけるADの症度変化の検出のためのマーカー（該被験者のための個人用マーカー）を用いた、該被験者におけるADの症度変化の検出方法を提供する。本発明によるADの症度変化の検出方法（以下、本検出方法という）では、被験者のための個人用マーカーの発現レベルの変化に基づいて、該被験者におけるADの症度変化（例えば症状の増悪又は非増悪）を検出する。該個人用マーカーの発現レベルの増加は、被験者のADの症度の増悪を表し、一方、発現レベルの非増加は、被験者のADの症度の非増悪を表す。

[0090] 本検出方法は、被験者から採取した生体試料における、該被験者のための個人用マーカーの発現レベルを測定することを含む。本検出方法は、被験者から生体試料を採取することをさらに含んでもよい。

[0091] 本検出方法に供される被験者の例としては、ヒト及び非ヒト哺乳動物を含む哺乳動物が挙げられ、好ましくはヒトである。被験者がヒトの場合、その性別、年齢及び人種等は特に限定されず、乳児から老人までを含み得る。例えば、ADの症度変化の検出を必要とする者又は希望する者、例えば、ADを発症している者などが挙げられる。該被験者のための個人用マーカーは、上記3. で述べた、被験者におけるADの症度変化を検出するマーカーの選択方法に基づいて、上記2. で述べた候補マーカーの中から、該被験者のために選択されたマーカーである。該被験者のための個人用マーカーは、本検

出方法の前に予め特定されていてもよく、または本検出方法の手順の中で特定してもよい。採取される生体試料の種類、及びマーカーの発現レベルの測定手順は、前記個人用マーカーの選択方法の場合と同様である。発現レベルを測定する個人用マーカーの数には特に制限はなく、1つであっても複数であってもよい。個人用マーカーは、核酸マーカーであっても、タンパク質マーカーであってもよい。あるいは、核酸マーカーとタンパク質マーカーを組み合わせ使用してもよい。好ましくは、該生体試料はSSLであり、該マーカーはSSL由来RNAである。SSLの採取、SSLからのマーカーの抽出、及びSSL由来RNAの発現レベルの測定の手順は、上述したとおりである。

[0092] 本検出方法においては、ある時期（基準時）に測定された同じ被験者における同じマーカーの発現レベルを基準値として設定することができる。例えば、測定した該個人用マーカーの発現レベルが基準値よりも高い場合、該被験者のADの症度は基準時より増悪したと検出することができ、一方、該個人用マーカーの発現レベルが基準値よりも低いか又は差異がない場合、該被験者のADの症度は基準時より増悪していないと検出することができる。

一実施形態においては、被験者における該個人用マーカーの発現レベルを経時的に測定し、2回目以降のいずれかの測定回での発現レベルを、前回又はそれ以前の測定回での発現レベル（これが基準値となる）と比較する。基準値より高い発現レベルは、該被験者におけるADの症度の増悪を表し、基準値よりも低いか又は差異がない発現レベルは、該被験者におけるADの症度の非増悪を表す。

別の一実施形態においては、ある時期（基準時）に被験者のADの症度を決定するとともに、該被験者における該個人用マーカーの発現レベルを測定し、基準値として設定する。その後、該被験者で該個人用マーカーの発現レベルを測定し、基準値と比較する。基準値より高い発現レベルは、該被験者におけるADの症度の基準時からの増悪を表し、基準値よりも低いか又は差異がない発現レベルは、該被験者におけるADの症度の基準時からの非増悪

を表す。

[0093] 一実施形態において、個人用マーカの発現レベルが、基準値に対して統計学的に有意に低い場合、該マーカの発現レベルは基準値より低いと判断され得、個人用マーカの発現レベルが、基準値に対して統計学的に有意に高い場合、該マーカの発現レベルは基準値より高いと判断され得る。

別の実施形態において、個人用マーカの発現レベルが、基準値に対して好ましくは99%以下、より好ましくは95%以下、さらに好ましくは91%以下であれば、該マーカの発現レベルは基準値より低いと判断され得、個人用マーカの発現レベルが、基準値に対して好ましくは101%以上、より好ましくは105%以上、さらに好ましくは110%以上であれば、該マーカの発現レベルは基準値より高いと判断され得る。

個人用マーカとして複数のマーカを用いる場合には、個々のマーカの発現レベルを基準値と比較し、一定割合、例えば50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは100%のマーカの発現レベルが基準値と異なるか否かを調べることで、ADの症度変化を検出することができる。

[0094] 好ましい実施形態において、本検出方法で検出されるADの症度は、ADによる全身の皮疹の症度、皮膚の痒みの症度、皮膚の乾燥の症度、及び顔面部紅斑の症度からなる群より選択される少なくとも1つである。別の好ましい実施形態において、本検出方法で検出されるADの症度は、ADによる全身の皮疹に係るEASIスコア及びPOEMスコア、ADによる皮膚の痒みのVASスコア、ADによる皮膚乾燥のVASスコア、ならびにADによる顔面部紅斑に係る紅斑インデックスからなる群より選択される少なくとも1つである。本検出方法で検出されるADの症度の種類は、使用される個人用マーカの種類によって異なり得る。

一例において、本検出方法で用いられる個人用マーカが少なくとも1つの表3に示す遺伝子又はその発現産物を含む場合、ADによる全身の皮疹の症度の変化、例えばEASIスコアに対応するADの症度の変化を検出する

ことができる。

別の一例において、本検出方法で用いられる個人用マーカーが少なくとも1つの表4に示す遺伝子又はその発現産物を含む場合、ADによる全身の皮疹の症度の変化、例えばPOEMスコアに対応するADの症度の変化を検出することができる。

別の一例において、本検出方法で用いられる個人用マーカーが少なくとも1つの表5に示す遺伝子又はその発現産物を含む場合、ADによる皮膚の痒みの症度の変化、例えば皮膚の痒みのVASスコアに対応するADの症度の変化を検出することができる。

別の一例において、本検出方法で用いられる個人用マーカーが少なくとも1つの表6に示す遺伝子又はその発現産物を含む場合、ADによる皮膚の乾燥の症度の変化、例えば皮膚乾燥のVASスコアに対応するADの症度の変化を検出することができる。

別の一例において、本検出方法で用いられる個人用マーカーが少なくとも1つの表7に示す遺伝子又はその発現産物を含む場合、ADによる顔面部紅斑の症度の変化、例えば顔面部紅斑の紅斑インデックスに対応するADの症度の変化を検出することができる。

別の一例において、本検出方法で用いられる個人用マーカーが表3～7に示す遺伝子又はその発現産物をそれぞれ含む場合、ADによる全身の皮疹の症度、皮膚の痒みの症度、皮膚の乾燥の症度、及び顔面部紅斑の症度の変化、例えばEASIスコア、POEMスコア、皮膚の痒みのVASスコア、皮膚乾燥のVASスコア、及び顔面部紅斑の紅斑インデックスにそれぞれ対応するADの症度の変化を全て検出することができる。

[0095] (5. AD症度変化の検出キット)

さらなる一態様において、本発明は、上記4. で説明した本発明によるADの症度変化の検出方法に従って被験者におけるADの症度変化を検出するためのキットを提供する。一実施形態において、本発明のキットは、上述した表2に示すマーカーの発現レベルを測定するための試薬又は器具を備える

。例えば、本発明のキットは、核酸マーカを増幅又は定量するための試薬（例えば、逆転写酵素、PCR用試薬、プライマー、プローブ、シーケンシング用アダプター配列等）、又はタンパク質マーカを定量するための試薬（例えば、免疫学的測定のための試薬、抗体など）を備え得る。好ましくは、本発明のキットは、核酸マーカと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド（例えば、PCR用のプライマー、又はプローブ）、あるいは、タンパク質マーカを認識する抗体を含有する。好ましくは、本発明のキットは、マーカの発現レベルを検出するための指標又はガイダンスを備える。例えば、本発明のキットは、各マーカに関係するADの症状（例えば皮膚疹、皮膚痒み、皮膚乾燥、顔面部紅斑）を説明するガイダンスを備え得る。また本発明のキットは、生体試料採取デバイス（例えば、上記のSSL吸収性素材又はSSL接着性素材）、生体試料からマーカを抽出するための試薬（例えば核酸精製用試薬）、生体試料採取後の試料採取デバイスの保存剤や保存用容器などをさらに備えていてもよい。

[0096] 本発明の例示的实施形態として、以下の物質、製造方法、用途、方法等をさらに本明細書に開示する。但し、本発明はこれらの実施形態に限定されない。

[0097] [1] 被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカを選択する方法であって、

1) 経時的に隔てられた複数の時期での被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコアと、該複数の時期に該被験者から採取した生体試料における、上記表1に示す遺伝子又はその発現産物のいずれか1つの発現レベルに基づいて、下記P1及びP2を算出すること、

[数7]

$$P1 = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(S_{k+1} - S_k) \quad \dots (1a)$$

$$P2 = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(E_{k+1} - E_k) \quad \dots (2b)$$

ただし、 $f(x) = 1$ ($x > 0$ の場合)

$f(x) = 0$ ($x \leq 0$ の場合)

ここで、

n は、該被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコア及び生体試料を取得した回数の総数を表し、

k は、該被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコア及び生体試料の取得順を表し、

S_k は、 k 回目に測定した該被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコアを表し、

E_k は、 k 回目に採取した生体試料における該遺伝子又はその発現産物の発現レベルを表す、

2) $P_1 = P_2$ となった場合に、該遺伝子又はその発現産物を、該被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーとして決定すること、

を含む、方法。

〔2〕好ましくは、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度、又はアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度である、〔1〕記載の方法。

〔3〕好ましくは、前記遺伝子又はその発現産物が、表3に示す遺伝子及びその発現産物のいずれか1つであり、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度である、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔4〕好ましくは、前記アトピー性皮膚炎の症度がEAS1に対応するアトピー性皮膚炎の症度である、〔3〕記載の方法。

〔5〕好ましくは、前記遺伝子又はその発現産物が、表4に示す遺伝子及びその発現産物のいずれか1つであり、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度である、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔6〕好ましくは、前記アトピー性皮膚炎の症度がPOEMに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、〔5〕記載の方法。

〔7〕好ましくは、前記遺伝子又はその発現産物が、表5に示す遺伝子及びその発現産物のいずれか1つであり、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度である、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔8〕好ましくは、前記アトピー性皮膚炎の症度が皮膚の痒みのVASスコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、〔7〕記載の方法。

〔9〕好ましくは、前記遺伝子又はその発現産物が、表6に示す遺伝子及びその発現産物のいずれか1つであり、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度である、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔10〕好ましくは、前記アトピー性皮膚炎の症度が、皮膚乾燥のVASスコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、〔9〕記載の方法。

〔11〕好ましくは、前記遺伝子又はその発現産物が、表7に示す遺伝子及びその発現産物のいずれか1つであり、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度である、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔12〕好ましくは、前記アトピー性皮膚炎の症度が顔面部紅斑に係る紅斑インデックスに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、〔11〕記載の方法。

〔13〕前記経時的に隔てられた複数の時期が、好ましくは1日以上、より好ましくは3日以上、さらに好ましくは1週間以上、さらに好ましくは1週間以上4週間以下、さらに好ましくは12日間以上16日間以下の間隔を空けた、複数の時期である、〔1〕～〔12〕のいずれか1項記載の方法。

〔14〕nが、好ましくは3以上、より好ましくは4以上であり、かつ好ましくは10以下、より好ましくは8以下である、〔1〕～〔13〕のいずれか1項記載の方法。

〔15〕好ましくは、前記生体試料が皮膚表上脂質である、〔1〕～〔14〕のいずれか1項記載の方法。

〔16〕好ましくは、前記遺伝子又はその発現産物の発現レベルが、皮膚表上脂質に含まれるRNAの発現レベルである、〔15〕記載の方法。

[0098] [17] 被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出方法であって、
被験者から採取した生体試料における、[1]～[16]のいずれか1項記載の方法で決定されたアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーの発現レベルを測定すること、

該マーカーの発現レベルの変化に基づいて、該被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化を検出すること、
を含む、方法。

[18] 好ましくは、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度、又はアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度である、[17]記載の方法。

[19] 好ましくは、前記マーカーが表3に示す遺伝子及びその発現産物からなる群より選択される少なくとも1つを含み、

前記アトピー性皮膚炎の症度が、好ましくはアトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度であり、より好ましくはEAS1に対応するアトピー性皮膚炎の症度である、

[17]又は[18]記載の方法。

[20] 好ましくは、前記マーカーが表4に示す遺伝子及びその発現産物からなる群より選択される少なくとも1つを含み、

前記アトピー性皮膚炎の症度が、好ましくはアトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度であり、より好ましくはPOEMに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、

[17]又は[18]記載の方法。

[21] 好ましくは、前記マーカーが表5に示す遺伝子及びその発現産物からなる群より選択される少なくとも1つを含み、

前記アトピー性皮膚炎の症度が、好ましくはアトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度であり、より好ましくは皮膚の痒みのVASスコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、

〔17〕又は〔18〕記載の方法。

〔22〕好ましくは、前記マーカ―が表6に示す遺伝子及びその発現産物からなる群より選択される少なくとも1つを含み、

前記アトピー性皮膚炎の症度が、好ましくはアトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度であり、より好ましくは皮膚乾燥のVASスコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、

〔17〕又は〔18〕記載の方法。

〔23〕好ましくは、前記マーカ―が表7に示す遺伝子及びその発現産物からなる群より選択される少なくとも1つを含み、

前記アトピー性皮膚炎の症度が、好ましくはアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度であり、より好ましくは顔面部紅斑に係る紅斑インデックスに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、

〔17〕又は〔18〕記載の方法。

〔24〕好ましくは、前記マーカ―が表3～7に示す遺伝子又はその発現産物をそれぞれ含み、

前記アトピー性皮膚炎の症度が、好ましくは、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度、及びアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度であり、より好ましくは、EASIスコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度、POEMに対応するアトピー性皮膚炎の症度、皮膚の痒みのVASスコア、皮膚乾燥のVASスコア、及び顔面部紅斑に係る紅斑インデックスに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、

〔17〕又は〔18〕記載の方法。

〔25〕好ましくは、前記マーカ―の発現レベルが基準値よりも高い場合、前記被験者のアトピー性皮膚炎の症度は該基準値が測定された時期よりも増悪したと検出され、一方、前記マーカ―の発現レベルが基準値よりも低い又は差異がない場合、前記被験者のアトピー性皮膚炎の症度は該基準値が測定された時期よりも増悪していないと検出される、〔17〕～〔24〕のい

ずれか1項記載の方法。

〔26〕好ましくは、前記基準値が、

特定の時期に測定された前記被験者における前記マーカの発現レベルであるか、

過去に測定された前記被験者における前記マーカの発現レベルである、

〔25〕記載の方法。

〔27〕好ましくは、前記マーカの発現レベルが前記基準値に対して統計学的に有意に高い場合、該マーカの発現レベルは該基準値より高いと判断される、〔25〕又は〔26〕記載の方法。

〔28〕好ましくは、前記マーカの発現レベルが前記基準値に対して101%以上、より好ましくは105%以上、さらに好ましくは110%以上である場合、該マーカの発現レベルは該基準値より高いと判断される、〔25〕又は〔26〕記載の方法。

[0099] 〔29〕〔1〕～〔16〕のいずれか1項記載の方法で使用される遺伝子又はそれに由来する核酸と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、又は〔1〕～〔16〕のいずれか1項記載の方法で使用される遺伝子の発現産物を認識する抗体を含有する、〔17〕～〔28〕のいずれか1項記載の方法に用いられる、アトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのキット。

〔30〕上記表1に示す遺伝子又はそれに由来する核酸と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、又は上記表1に示す遺伝子の発現産物を認識する抗体を含有する、〔17〕～〔28〕のいずれか1項記載の方法に用いられる、アトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのキット。

〔31〕上記表1に示す遺伝子又はその発現産物からなる、アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカを選択するための候補マーカ。

〔32〕好ましくは、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度、又はアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度である、〔31〕記載の候補マーカ。

〔33〕好ましくは、前記候補マーカがアトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度変化の検出のためのマーカを選択するための候補マーカであり、かつ該候補マーカが、上記表3に示す遺伝子又はその発現産物である、

〔31〕又は〔32〕記載の候補マーカ。

〔34〕好ましくは、前記候補マーカがEASI (Eczema Area and Severity Index) に対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカを選択するための候補マーカである、〔33〕記載の候補マーカ。

〔35〕好ましくは、前記候補マーカがアトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度変化の検出のためのマーカを選択するための候補マーカであり、かつ該候補マーカが、上記表4に示す遺伝子又はその発現産物である、

〔31〕又は〔32〕記載の候補マーカ。

〔36〕好ましくは、前記候補マーカがPOEM (Patient Oriented Eczema Measure) に対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカを選択するための候補マーカである、〔35〕記載の候補マーカ。

〔37〕好ましくは、前記候補マーカがアトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度変化の検出のためのマーカを選択するための候補マーカであり、かつ該候補マーカが、上記表5に示す遺伝子又はその発現産物である、

〔31〕又は〔32〕記載の候補マーカ。

〔38〕好ましくは、前記候補マーカが皮膚の痒みのVAS (Visual Analog Scaling) スコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカを選択するための候補マーカである、

〔37〕記載の候補マーカ。

〔39〕好ましくは、前記候補マーカがアトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度変化の検出のためのマーカを選択するための候補マーカであり、かつ該候補マーカが、上記表6に示す遺伝子又はその発現産物である、

〔31〕又は〔32〕記載の候補マーカ。

〔40〕好ましくは、前記候補マーカが皮膚乾燥のVAS (Visual Analog Scaling) スコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカを選択するための候補マーカである、〔39〕記載の候補マーカ。

〔41〕好ましくは、前記候補マーカがアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度変化の検出のためのマーカを選択するための候補マーカであり、かつ該候補マーカが、上記表7に示す遺伝子又はその発現産物である、〔31〕又は〔32〕記載の候補マーカ。

〔42〕好ましくは、前記候補マーカが顔面部紅斑に係る紅斑インデックスに対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカを選択するための候補マーカである、〔41〕記載の候補マーカ。

〔43〕上記表1に示す遺伝子又はその発現産物の、アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカを選択するための候補マーカとしての使用、又はアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカを選択するための候補マーカの製造における使用。

〔44〕好ましくは、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度、又はアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度である、〔43〕記載の使用。

〔45〕好ましくは、前記候補マーカがアトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度変化の検出のためのマーカを選択するための候補マーカであり、かつ該候補マーカが、上記表3に示す遺伝子又はその発現産物である、〔43〕又は〔44〕記載の使用。

〔46〕好ましくは、前記候補マーカがEASI (Eczema Area and Severity Index) に対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカを選択するための候補マーカである、〔45〕記載の使用。

〔47〕好ましくは、前記候補マーカがアトピー性皮膚炎による全身の皮

疹の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーであり、かつ該候補マーカーが、上記表4に示す遺伝子又はその発現産物である、〔43〕又は〔44〕記載の使用。

〔48〕好ましくは、前記候補マーカーがPOEM (Patient Oriented Eczema Measure) に対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカーを選択するための候補マーカーである、〔47〕記載の使用。

〔49〕好ましくは、前記候補マーカーがアトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーであり、かつ該候補マーカーが、上記表5に示す遺伝子又はその発現産物である、〔43〕又は〔44〕記載の使用。

〔50〕好ましくは、前記候補マーカーが皮膚の痒みのVAS (Visual Analog Scaling) スコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカーを選択するための候補マーカーである、〔49〕記載の使用。

〔51〕好ましくは、前記候補マーカーがアトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーであり、かつ該候補マーカーが、上記表6に示す遺伝子又はその発現産物である、〔43〕又は〔44〕記載の使用。

〔52〕好ましくは、前記候補マーカーが皮膚乾燥のVAS (Visual Analog Scaling) スコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカーを選択するための候補マーカーである、〔51〕記載の使用。

〔53〕好ましくは、前記候補マーカーがアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーであり、かつ該候補マーカーが、上記表7に示す遺伝子又はその発現産物である、〔43〕又は〔44〕記載の使用。

〔54〕好ましくは、前記候補マーカーが顔面部紅斑に係る紅斑インデック

スに対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカーを選択するための候補マーカーである、〔53〕記載の使用。

実施例

[0100] 以下、実施例に基づき本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1 SSL由来RNAを用いたアトピー性皮膚炎の症度変化に関連する遺伝子の探索

1) アトピー性皮膚炎患者の症度に係るスコアの取得及びSSL採取

アトピー性皮膚炎(AD)を有する成人18名(23~57歳、男性)を被験者とした。被験者は、初回測定時に皮膚科専門医により重症度が軽症及び中等症のアトピー性皮膚炎であるとの診断を受けたAD患者であった。被験者は14日おきに計4回来場し、ADの症度に係るスコアの取得とSSLの採取を受けた。以下では、集めたADの症度に係るスコア及びSSLをそれぞれ、初回の来場からの順番に基づき、1回目、2回目、3回目、4回目のAD症度スコア及びSSLサンプルと称する。AD症度スコアとして、医師による全身のEASIスコア(Hanifin et al., *Exp Dermatol*, 10, 2001、全身の皮疹に基づき症状を0~72までにスコアリングする)と、被験者自身による、全身のPOEMスコア(Charman et al., *Arch Dermatol*, 140, 2004、全身の皮疹に基づき症状を0~28までにスコアリングする)、全身の皮膚の痒みのVASスコア(痒みの強さを0~100までにスコアリングする)及び全身の皮膚の乾燥のVASスコア(乾燥の強さを0~100までにスコアリングする)と、ハイパースペクトラルイメージング装置(ハイパースペクトルカメラNH-7、エバ・ジャパン社)による顔面部画像に基づく顔面部の紅斑インデックス(特開2018-23756号公報、及びDawson et al., *Phys Med Biol*, 25, 1980を参照)とをそれぞれ用いた。顔面部の紅斑インデックスの計算では、下式(4)に従ってハイパースペクトラルイメージング装置による顔面部正面画像

上の各画素ごとに紅斑インデックスを算出した。画像上の額、両目の上部及び両頬に相当する部分に任意のROI (Region of Interest) を定め、5か所のROIでの紅斑インデックスの平均値を顔面部の紅斑インデックスとして用いた。

[0101] [数8]

$$\text{紅斑インデックス} = 100 \{A_{560} + 1.5(A_{543} + A_{576}) - 2(A_{510} + A_{610})\} \quad \dots (4)$$

ここで、 $A_{\lambda} = \log_{10} (1/R_{\lambda})$

A_{λ} ; 波長 λ における見かけの吸光度

R_{λ} ; 波長 λ における反射率

[0102] 各被験者の全顔からあぶら取りフィルム (5×8 cm、ポリプロピレン製、3M社) を用いて皮脂を回収した。該あぶら取りフィルムをバイアルに移し、RNA抽出に使用するまで−80℃で約1ヶ月間保存した。

[0103] 2) RNA調製及びシーケンシング

上記1) のあぶら取りフィルムを適当な大きさに切断し、QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) を用いて、付属のプロトコルに準じてRNAを水層に移行させた。該水層から、RNA抽出用スピナラムを用いた市販のRNA抽出キットを用いて、付属のプロトコルに従いRNAを抽出した。抽出されたRNAを、SuperScript VILOC DNA Synthesis kit (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いて42℃、90分間逆転写し、cDNAを合成した。逆転写反応のプライマーには、キットに付属しているランダムプライマーを使用した。得られたcDNAから、マルチプレックスPCRにより20802遺伝子に由来するDNAを含むライブラリーを調製した。マルチプレックスPCRは、Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いて、[99℃、2分→(99℃、15秒→62℃、16分)×20サイクル→4℃、Hold] の条件で行った。得られたPCR産物は、Ampure XP (ベックマン・コールター株式会社) で精製した

後に、バッファの再構成、プライマー配列の消化、アダプターライゲーションと精製、及び増幅を行い、ライブラリーを調製した。調製したライブラリーを Ion 540 Chip にローディングし、Ion S5/XL システム（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）を用いてシーケンシングした。シーケンシングで得られた各リード配列をヒトゲノムのリファレンス配列である hg19 AmpliSeq Transcriptome ERCC v1 を用いて遺伝子マッピングすることで各リード配列の由来する遺伝子を決定した。

[0104] 3) 使用データ

上記2) で測定した被験者の SSL 由来 RNA のシーケンシングによる各リードのリードカウントを、各 RNA の発現レベルのデータとした。シーケンシングでの増幅領域が少なくとも2つ以上のエクソンをまたぐ遺伝子を解析対象遺伝子とした。サンプル間の総リードカウントの違いを補正するため、解析対象遺伝子のリードカウントを RPM (Reads per million mapped reads) 値に変換した。この中で、90%以上のサンプルで20以上のリードカウントが得られている4845遺伝子を以下の解析に使用した。さらに、RPM値を正規分布に近似するため、整数1を加算した底2の対数值 ($\log_2(\text{RPM} + 1)$ 値) に変換した。以上の手順で、18名の被験者からの1回目、2回目、3回目、及び4回目のSSLサンプルのそれぞれについて、4845遺伝子の発現レベルデータ ($\log_2(\text{RPM} + 1)$ 値) を作成した。これらをそれぞれ、初回の来場からの順番に基づき、1回目、2回目、3回目、及び4回目の発現レベルと称する。

[0105] 4) データ解析

上記1) で取得した18名のAD患者のそれぞれについて、1~4回目のAD症度スコアを基に、14日間毎の症度変化の推移を示す指標である $P1_j$ を下式(1)'に従って算出した。 $P1_j$ は、AD症度スコアの推移パターンに基づき、「0、1、10、11、100、101、110、111」の8通りの値のいずれかの値となる。

[0106] [数9]

$$P1_j = \sum_{k=1}^3 10^{k-1} \cdot f(S_{j,k+1} - S_{j,k}) \quad \dots (1)'$$

ただし、 $f(x) = 1(x > 0 \text{ の場合})$
 $f(x) = 0(x \leq 0 \text{ の場合})$

[0107] 式(1)'中、

jはサンプル(又は被験者)IDを表し、本実施例ではj=1~18の整数であり、

kはAD症度スコアの取得順を表し、本実施例ではスコアを4回取得したのでk=1~3の整数であり、

$S_{j,k}$ はIDがjの被験者におけるk回目のAD症度スコアを表す。

[0108] 次に、上記3)で算出された18名のAD患者のそれぞれについての、1~4回目の発現レベルデータ($\log_2(RPM+1)$ 値)を基に、14日間毎の遺伝子発現レベルの推移を示す指標である $P2_{i,j}$ を、下式(2)'に従って算出した。 $P2_{i,j}$ は、遺伝子発現レベルの推移パターンに基づき、「0、1、10、11、100、101、110、111」の8通りの値のいずれかの値となる。

[0109] [数10]

$$P2_{i,j} = \sum_{k=1}^3 10^{k-1} \cdot f(E_{i,j,k+1} - E_{i,j,k}) \quad \dots (2)'$$

ただし、 $f(x) = 1(x > 0 \text{ の場合})$
 $f(x) = 0(x \leq 0 \text{ の場合})$

[0110] 式(2)'中、

iは遺伝子IDを表し、本実施例ではi=1~4845の整数であり、

jは被験者IDを表し、本実施例ではj=1~18の整数であり、

kはSSLサンプル取得順を表し、本実施例ではk=1~3の整数であり、

$E_{i,j,k}$ はIDがjの被験者からk回目に採取したSSLサンプルにおけるIDがiの遺伝子についての発現レベルを表す。

[0111] このとき、IDがj(j=1~18)のサンプル(又は被験者)から、I

D毎に固定の P_{1j} と、当該サンプルにおけるIDが i ($i = 1 \sim 4845$)の遺伝子について $P_{2_{i,j}}$ が取得される。

ここで、帰無仮説 H_0 と対立仮説 H_1 を次のように定めた。

H_0 : $P_{2_{i,j}}$ が「0、1、10、11、100、101、110、111」の8通りの値をとる確率はそれぞれ等しく $1/8$ である

H_1 : $P_{2_{i,j}}$ が「0、1、10、11、100、101、110、111」の8通りの値をとる確率はそれぞれ等しく $1/8$ でない

帰無仮説が成立する場合、 $P_{2_{i,j}}$ はそれぞれ $1/8$ の確率で「0、1、10、11、100、101、110、111」の8通りの値をとり得、 $P_{1j} = P_{2_{i,j}}$ となる確率は $1/8$ であるものとし、帰無仮説を棄却できる場合は対立仮説を採択し、 $P_{1j} = P_{2_{i,j}}$ となる確率は $1/8$ ではないとする。

[0112] 次に、4845遺伝子を対象に、IDが i の遺伝子において $P_{1j} = P_{2_{i,j}}$ となったサンプル数をカウントし、その数を一致数 m_i とした。帰無仮説 H_0 ($P_{1j} = P_{2_{i,j}}$ となる確率は $1/8$) が成立すると仮定した場合に、18サンプル中 m_i サンプルで $P_{1j} = P_{2_{i,j}}$ となる確率 p_i を下式(3)'から算出した。 p_i が片側の有意水準0.005を下回った場合、帰無仮説 H_0 を棄却し、対立仮説 H_1 を採択した。

[0113] [数11]

$$p_i = \frac{{}^{18}C_{m_i} \times 7^{18-m_i}}{8^{18}} \quad \dots (3)'$$

[0114] 5) AD症度スコアと連動する遺伝子

i) EAS Iスコアと連動する遺伝子

AD症度スコアとしてEAS Iスコアを用いた4)での解析の結果、表8に示す23遺伝子において、18サンプル中7サンプル以上で P_{1j} と $P_{2_{i,j}}$ が一致し、 p_i が有意水準を下回った。すなわち、表8に示す23遺伝子における $P_{1j} = P_{2_{i,j}}$ となる確率は $1/8$ ではなく、したがって、これら23遺伝子が、偶然ではなくEAS Iスコアと連動している可能性が示された。また、表8に示す23遺伝子のうちの20遺伝子(表中*で示した)について

は、これまでにアトピー性皮膚炎との関連性を示唆する報告がないことから、新規なアトピー性皮膚炎の症度変化、好ましくはEASISコアに反映されるアトピー性皮膚炎による皮疹の症度変化のマーカーとなり得ると判断された。

[0115] [表8]

Gene Symbol	一致数 m_i	確率 p_i
* CLTC	8	0.0006861
* PDZD8	8	0.0006861
* CEACAM1	7	0.003493
* CRISPLD2	7	0.003493
* EFTUD2	7	0.003493
* GTF2H1	7	0.003493
* LDHA	7	0.003493
* NSFP1	7	0.003493
* PKP1	7	0.003493
* PSMA1	7	0.003493
* RABGGTB	7	0.003493
S100A12	7	0.003493
* SERPINB1	7	0.003493
* SF3B1	7	0.003493
* SIGLEC5	7	0.003493
SLPI	7	0.003493
* STEAP4	7	0.003493
* TMED10	7	0.003493
* TMED5	7	0.003493
* TPMT	7	0.003493
VAMP3	7	0.003493
* YWHAB	7	0.003493
* ZDHHC12	7	0.003493

[0116] ii) POEMスコアと連動する遺伝子

AD症度スコアとしてPOEMスコアを用いた4)での解析の結果、表9に示す7遺伝子において、18サンプル中7サンプル以上で P_{1j} と $P_{2,j}$ が一致し、 p_j が有意水準を下回った。すなわち、表9に示す7遺伝子における $P_{1j} = P_{2,j}$ となる確率は $1/8$ ではなく、したがって、これら7遺伝子が、偶然ではなくPOEMスコアと連動している可能性が示された。また、表

9に示す7遺伝子のうちの6遺伝子（表中*で示した）については、これまでにアトピー性皮膚炎との関連性を示唆する報告がないことから、新規なアトピー性皮膚炎の症度変化、好ましくはPOEMスコアに反映されるアトピー性皮膚炎による皮疹の症度変化のマーカーとなり得ると判断された。

[0117] [表9]

Gene Symbol	一致数 m_i	確率 p_i
IL18	8	0.0006861
* BNIP3L	7	0.003493
* CD1E	7	0.003493
* DDHD1	7	0.003493
* MLF2	7	0.003493
* NPC1	7	0.003493
* SCNN1B	7	0.003493

[0118] iii) 痒みVASスコアと連動する遺伝子

AD症度スコアとして皮膚痒みのVASスコアを用いた4)での解析の結果、表10に示す27遺伝子において、18サンプル中7サンプル以上で P_{1j} と P_{2ij} が一致し、 p_i が有意水準を下回った。すなわち、表10に示す27遺伝子における $P_{1j} = P_{2ij}$ となる確率は $1/8$ ではなく、したがって、これら27遺伝子が、偶然ではなく皮膚痒みのVASスコアと連動している可能性が示された。また、表10に示す27遺伝子のうちの24遺伝子（表中*で示した）については、これまでにアトピー性皮膚炎との関連性を示唆する報告がないことから、新規なアトピー性皮膚炎の症度変化、好ましくは皮膚痒みのVASスコアに反映されるアトピー性皮膚炎による皮膚の痒み症状の症度変化のマーカーとなり得ると判断された。

[0119]

[表10]

	Gene Symbol	一致数 m_i	確率 p_i
*	KDM5D	11	1.455E-06
*	RBM7	8	0.0006861
*	CCDC125	7	0.003493
*	CDKAL1	7	0.003493
*	CERS5	7	0.003493
	CSF1	7	0.003493
	CXCR4	7	0.003493
*	DAD1	7	0.003493
*	EMC2	7	0.003493
*	FAM210A	7	0.003493
*	GBP1	7	0.003493
*	GHITM	7	0.003493
*	HSBP1	7	0.003493
*	IGSF6	7	0.003493
*	LSM1	7	0.003493
*	MOSPD2	7	0.003493
*	MXD1	7	0.003493
*	NUDC	7	0.003493
*	NUP58	7	0.003493
*	PDXK	7	0.003493
*	PRDX3	7	0.003493
*	PRKAR1A	7	0.003493
*	PTPN1	7	0.003493
*	SERINC1	7	0.003493
*	SRRM2	7	0.003493
	STAT1	7	0.003493
*	TM2D1	7	0.003493

[0120] iv) 乾燥VASスコアと連動する遺伝子

A D症度スコアとして皮膚乾燥のVASスコアを用いた4)での解析の結果、表11に示す26遺伝子において、18サンプル中7サンプル以上で P_{1j} と P_{2ij} が一致し、 p_i が有意水準を下回った。すなわち、表11に示す26遺伝子における $P_{1j} = P_{2ij}$ となる確率は $1/8$ ではなく、したがって、これら26遺伝子が、偶然ではなく皮膚乾燥のVASスコアと連動している可能性が示された。また、表11に示す26遺伝子のうち全26遺伝子(表中*で示した)については、これまでにアトピー性皮膚炎との関連性を示

唆する報告がないことから、新規なアトピー性皮膚炎の症度変化、好ましくは皮膚乾燥のVASスコアに反映されるアトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥症状の症度変化のマーカーとなり得ると判断された。

[0121] [表11]

	Gene Symbol	一致数 m_i	確率 p_i
*	RPLP0	9	0.0001089
*	MRPL23	8	0.0006861
*	RPL10A	8	0.0006861
*	CNKSR3	7	0.003493
*	ECHS1	7	0.003493
*	GPATCH2	7	0.003493
*	GSR	7	0.003493
*	HTATSF1	7	0.003493
*	MPC2	7	0.003493
*	MRPL42	7	0.003493
*	MRPS22	7	0.003493
*	MRPS24	7	0.003493
*	NDUFS6	7	0.003493
*	NFYC	7	0.003493
*	PHB	7	0.003493
*	RPL22	7	0.003493
*	RPL37A	7	0.003493
*	RPS12	7	0.003493
*	RPS4X	7	0.003493
*	SLC25A3	7	0.003493
*	SLIRP	7	0.003493
*	TBC1D9	7	0.003493
*	TOMM20	7	0.003493
*	TTC14	7	0.003493
*	UBE2K	7	0.003493
*	ZNF791	7	0.003493

[0122] v) 紅斑インデックスと連動する遺伝子

A D症度スコアとして顔面部の紅斑インデックスを用いた4)での解析の結果、表12に示す54遺伝子において、18サンプル中7サンプル以上で P_{1j} と P_{2ij} が一致し、 p_i が有意水準を下回った。すなわち、表12に示す54遺伝子における $P_{1j} = P_{2ij}$ となる確率は $1/8$ ではなく、したがって

、これら54遺伝子が、偶然ではなく顔面部の紅斑インデックスと連動している可能性が示された。また、表12に示す54遺伝子のうちの46遺伝子（表中*で示した）については、これまでにアトピー性皮膚炎との関連性を示唆する報告がないことから、新規なアトピー性皮膚炎の症度変化、好ましくは顔面部の紅斑インデックスに反映されるアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度変化のマーカーとなり得ると判断された。

[0123] [表12]

Gene Symbol	一致数 m_i	確率 p_i	Gene Symbol	一致数 m_i	確率 p_i
SERPINA3	9	0.0001089	* HIP1R	7	0.003493
* CCDC186	9	0.0001089	* IFFO2	7	0.003493
* NCOA2	9	0.0001089	* ING4	7	0.003493
* A2ML1	8	0.0006861	KLK11	7	0.003493
* BSPRY	8	0.0006861	KLK7	7	0.003493
* CHAC1	8	0.0006861	KLK9	7	0.003493
CLEC16A	8	0.0006861	* KPNB1	7	0.003493
* DNAJA1	8	0.0006861	* LRATD2	7	0.003493
* FCHSD1	8	0.0006861	* MED31	7	0.003493
* IFI27	8	0.0006861	MUC15	7	0.003493
* MAPK13	8	0.0006861	* NUA2	7	0.003493
* OSBP2	8	0.0006861	* PAN3	7	0.003493
* RXRB	8	0.0006861	* PDCD6	7	0.003493
* SLC22A23	8	0.0006861	* SASH1	7	0.003493
* SPRR2F	8	0.0006861	* SCNN1G	7	0.003493
* ACAT2	7	0.003493	* SDR9C7	7	0.003493
* AFTPH	7	0.003493	* SEC61A1	7	0.003493
* CLTB	7	0.003493	* SERPINA9	7	0.003493
* CPEB4	7	0.003493	* SMIM5	7	0.003493
* CTNBP1	7	0.003493	STAT5B	7	0.003493
* DNAJA3	7	0.003493	* TINCR	7	0.003493
* DOP1A	7	0.003493	* TMED7	7	0.003493
* FRMPD1	7	0.003493	* TMEM123	7	0.003493
* GAN	7	0.003493	* TRPC4AP	7	0.003493
* GDPD3	7	0.003493	* TUFT1	7	0.003493
* GJB5	7	0.003493	* VCP	7	0.003493
GRB7	7	0.003493	* ZFPL1	7	0.003493

[0124] 実施例2 アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーの選択

実施例1で見出されたEAS Iスコアと連動する各マーカー候補遺伝子について、18名の被験者における各遺伝子の発現レベルの推移パターンとEAS Iスコアの推移パターンとの一致性を調べた。発現レベルの推移パター

ンが被験者のEAS Iスコアの推移パターンと一致した遺伝子を、表13において丸印を付して示す。

[0125] [表13]

Gene Symbol	被験者 ID																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
CLTC	○				○		○			○	○		○			○	○	
PDZD8		○			○		○			○	○		○			○	○	
CEACAM1	○						○	○					○		○		○	○
CRISPLD2						○	○	○			○		○				○	○
EFTUD2		○			○		○			○	○		○				○	
GTF2H1	○						○				○		○	○		○	○	
LDHA			○	○	○		○		○				○				○	
NSFP1		○			○		○			○	○		○				○	
PKP1							○	○	○	○			○		○	○		
PSMA1		○	○				○		○	○			○			○		
RABGGTB		○	○	○			○			○	○					○		
SERPINB1			○	○		○	○						○				○	○
SF3B1	○	○		○			○	○								○	○	
SIGLEC5	○			○				○			○	○		○				○
STEAP4	○					○		○	○					○			○	○
TMED10		○	○				○		○				○			○	○	
TMED5					○		○	○	○		○		○				○	
TPMT		○		○			○	○			○		○				○	
YWHAB	○	○					○		○		○		○			○		
ZDHC12		○	○			○			○	○	○						○	

[0126] 表13の各被験者において、○印を付した遺伝子又はその発現産物は、当該被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度、特にEAS Iスコアで示される皮疹の症度の変化の検出のためのマーカーとして選択することができる。同様に、AD症度スコアとしてPOEM、痒みVAS、乾燥VAS及び紅斑インデックスを用いた場合においても、推移パターンが一致した遺伝子又はその発現産物を、当該被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーとして選択することができる。

請求の範囲

[請求項1] 被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーを選択する方法であって、

1) 経時的に隔てられた複数の時期での被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコアと、該複数の時期に該被験者から採取した生体試料における、下記表1に示す遺伝子又はその発現産物のいずれか1つの発現レベルに基づいて、下記P1及びP2を算出すること、

[数1]

$$P1 = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(S_{k+1} - S_k) \quad \dots (1a)$$

$$P2 = \sum_{k=1}^{n-1} 10^{k-1} \cdot f(E_{k+1} - E_k) \quad \dots (2b)$$

ただし、 $f(x) = 1$ ($x > 0$ の場合)

$f(x) = 0$ ($x \leq 0$ の場合)

ここで、

nは、該被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコア及び生体試料を取得した回数の総数を表し、

kは、該被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコア及び生体試料の取得順を表し、

S_k は、k回目に測定した該被験者のアトピー性皮膚炎の症度に係るスコアを表し、

E_k は、k回目に採取した生体試料における該遺伝子又はその発現産物の発現レベルを表す、

2) $P1 = P2$ となった場合に、該遺伝子又はその発現産物を、該被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーとして決定すること、

を含む、方法。

[表1]

Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol
CLTC	DAD1	NDUFS6	CTNNBIP1
PDZD8	EMC2	NFYC	DNAJA3
CEACAM1	FAM210A	PHB	DOP1A
CRISPLD2	GBP1	RPL22	FRMPD1
EFTUD2	GHITM	RPL37A	GAN
GTF2H1	HSBP1	RPS12	GDPD3
LDHA	IGSF6	RPS4X	GJB5
NSFP1	LSM1	SLC25A3	HIP1R
PKP1	MOSPD2	SLIRP	IFFO2
PSMA1	MXD1	TBC1D9	ING4
RABGGTB	NUDC	TOMM20	KPNB1
SERPINB1	NUP58	TTC14	LRATD2
SF3B1	PDXK	UBE2K	MED31
SIGLEC5	PRDX3	ZNF791	NUAK2
STEAP4	PRKAR1A	CCDC186	PAN3
TMED10	PTPN1	NCOA2	PDCD6
TMED5	SERINC1	A2ML1	SASH1
TPMT	SRRM2	BSPRY	SCNN1G
YWHAB	TM2D1	CHAC1	SDR9C7
ZDHHHC12	RPLP0	DNAJA1	SEC61A1
BNIP3L	MRPL23	FCHSD1	SERPINA9
CD1E	RPL10A	IFI27	SMIM5
DDHD1	CNKSR3	MAPK13	TINCR
MLF2	ECHS1	OSBP2	TMED7
NPC1	GPATCH2	RXR	TMEM123
SCNN1B	GSR	SLC22A23	TRPC4AP
KDM5D	HTATSF1	SPRR2F	TUFT1
RBM7	MPC2	ACAT2	VCP
CCDC125	MRPL42	AFTPH	ZFPL1
CDKAL1	MRPS22	CLTB	
CERS5	MRPS24	CPEB4	

[請求項2] 前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度、又はアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度である、請求項1記載の方法。

[請求項3] 前記遺伝子又はその発現産物が、以下の遺伝子：CLTC、PDZD8、CEACAM1、CRISPLD2、EFTUD2、GTF2H1、LDHA、NSFP1、PKP1、PSMA1、RABGGTB、SERPINB1、SF3B1、SIGLEC5、STEAP4、TMED10、TMED5、TPMT、YWHAB、及びZDHHHC12、ならびにその発現産物のいずれか1つであり、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度である、請求項1又は2記載の方法。

[請求項4] 前記アトピー性皮膚炎の症度がEASI (Eczema Area

and Severity Index) に対応するアトピー性皮膚炎の症度である、請求項3記載の方法。

[請求項5] 前記遺伝子又はその発現産物が、以下の遺伝子：BNIP3L、CD1E、DDHD1、MLF2、NPC1、及びSCNN1B、ならびにその発現産物のいずれか1つであり、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度である、請求項1又は2記載の方法。

[請求項6] 前記アトピー性皮膚炎の症度がPOEM (Patient Oriented Eczema Measure) に対応するアトピー性皮膚炎の症度である、請求項5記載の方法。

[請求項7] 前記遺伝子又はその発現産物が、以下の遺伝子：KDM5D、RBM7、CCDC125、CDKAL1、CERS5、DAD1、EMC2、FAM210A、GBP1、GHITM、HSBP1、IGSF6、LSM1、MOSPD2、MXD1、NUDC、NUP58、PDXK、PRDX3、PRKAR1A、PTPN1、SERINC1、SRRM2、及びTM2D1、ならびにその発現産物のいずれか1つであり、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度である、請求項1又は2記載の方法。

[請求項8] 前記アトピー性皮膚炎の症度が皮膚の痒みのVAS (Visual Analog Scaling) スコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、請求項7記載の方法。

[請求項9] 前記遺伝子又はその発現産物が、以下の遺伝子：RPLP0、MRPL23、RPL10A、CNKSR3、ECHS1、GPATCH2、GSR、HTATSF1、MPC2、MRPL42、MRPS22、MRPS24、NDUFS6、NFYC、PHB、RPL22、RPL37A、RPS12、RPS4X、SLC25A3、SLIRP、TBC1D9、TOMM20、TTC14、UBE2K、及びZNF791、ならびにその発現産物のいずれか1つであり、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度である、請求項1又は2記載の方法。

[請求項10] 前記アトピー性皮膚炎の症度が、皮膚乾燥のVAS (Visual Analog Scaling) スコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、請求項9記載の方法。

- [請求項11] 前記遺伝子又はその発現産物が、以下の遺伝子：CCDC186、NCOA2、A2ML1、BSPRY、CHAC1、DNAJA1、FCHSD1、IFI27、MAPK13、OSBP2、RXRB、SLC22A23、SPRR2F、ACAT2、AFTPH、CLTB、CPEB4、CTNNBIP1、DNAJA3、DOP1A、FRMPD1、GAN、GDPD3、GJB5、HIP1R、IFFO2、ING4、KPNB1、LRATD2、MED31、NUAK2、PAN3、PDCD6、SASH1、SCNN1G、SDR9C7、SEC61A1、SERPINA9、SMIM5、TINCR、TMED7、TMEM123、TRPC4AP、TUFT1、VCP、及びZFPL1、ならびにその発現産物のいずれか1つであり、前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項12] 前記アトピー性皮膚炎の症度が顔面部紅斑に係る紅斑インデックスに対応するアトピー性皮膚炎の症度である、請求項11記載の方法。
- [請求項13] 前記経時的に隔てられた複数の時期が、12日間以上16日間以下の間隔を空けた複数の時期である、請求項1～12のいずれか1項記載の方法。
- [請求項14] n が3以上である、請求項1～13のいずれか1項記載の方法。
- [請求項15] 前記生体試料が皮膚表上脂質である、請求項1～14のいずれか1項記載の方法。
- [請求項16] 前記遺伝子又はその発現産物の発現レベルが、皮膚表上脂質に含まれるRNAの発現レベルである、請求項15記載の方法。
- [請求項17] 被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化の検出方法であって、被験者から採取した生体試料における、請求項1～16のいずれか1項記載の方法で決定されたアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーの発現レベルを測定すること、
該マーカーの発現レベルの変化に基づいて、該被験者におけるアトピー性皮膚炎の症度変化を検出すること、
を含む、方法。
- [請求項18] 請求項1～16のいずれか1項記載の方法で使用される遺伝子又はそれに由来する核酸と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチ

ド、又は請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載の方法で使用される遺伝子の発現産物を認識する抗体を含有する、請求項 17 記載の方法に用いられる、アトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのキット。

[請求項19]

下記表 2 に示す遺伝子又はその発現産物の、アトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーとしての使用、又はアトピー性皮膚炎の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーの製造における使用。

[表2]

Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol
CLTC	DAD1	NDUFS6	CTNNBIP1
PDZD8	EMC2	NFYC	DNAJA3
CEACAM1	FAM210A	PHB	DOP1A
CRISPLD2	GBP1	RPL22	FRMPD1
EFTUD2	GHITM	RPL37A	GAN
GTF2H1	HSBP1	RPS12	GDPD3
LDHA	IGSF6	RPS4X	GJB5
NSFP1	LSM1	SLC25A3	HIP1R
PKP1	MOSPD2	SLIRP	IFFO2
PSMA1	MXD1	TBC1D9	ING4
RABGGTB	NUDC	TOMM20	KPNB1
SERPINB1	NUP58	TTC14	LRATD2
SF3B1	PDXK	UBE2K	MED31
SIGLEC5	PRDX3	ZNF791	NUAK2
STEAP4	PRKAR1A	CCDC186	PAN3
TMED10	PTPN1	NCOA2	PDCD6
TMED5	SERINC1	A2ML1	SASH1
TPMT	SRRM2	BSPRY	SCNN1G
YWHAB	TM2D1	CHAC1	SDR9C7
ZDHHC12	RPLP0	DNAJA1	SEC61A1
BNIP3L	MRPL23	FCHSD1	SERPINA9
CD1E	RPL10A	IFI27	SMIM5
DDHD1	CNKSR3	MAPK13	TINCR
MLF2	ECHS1	OSBP2	TMED7
NPC1	GPATCH2	RXRB	TMEM123
SCNN1B	GSR	SLC22A23	TRPC4AP
KDM5D	HTATSF1	SPRR2F	TUFT1
RBM7	MPC2	ACAT2	VCP
CCDC125	MRPL42	AFTPH	ZFPL1
CDKAL1	MRPS22	CLTB	
CERS5	MRPS24	CPEB4	

[請求項20]

前記アトピー性皮膚炎の症度が、アトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度、アトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度、又はアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度である、請求項 19 記載の使用。

- [請求項21] 前記候補マーカーがアトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーであり、かつ該候補マーカーが、以下の遺伝子：CLTC、PDZD8、CEACAM1、CRISPLD2、EFTUD2、GTF2H1、LDHA、NSFP1、PKP1、PSMA1、RABGGTB、SERPINB1、SF3B1、SIGLEC5、STEAP4、TMED10、TMED5、TPMT、YWHAB、及びZDHC12、又はその発現産物である、請求項19又は20記載の使用。
- [請求項22] 前記候補マーカーがEASI (Eczema Area and Severity Index) に対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカーを選択するための候補マーカーである、請求項21記載の使用。
- [請求項23] 前記候補マーカーがアトピー性皮膚炎による全身の皮疹の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーであり、かつ該候補マーカーが、以下の遺伝子：BNIP3L、CD1E、DDHD1、MLF2、NPC1、及びSCNN1B、又はその発現産物である、請求項19又は20記載の使用。
- [請求項24] 前記候補マーカーがPOEM (Patient Oriented Eczema Measure) に対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカーを選択するための候補マーカーである、請求項23記載の使用。
- [請求項25] 前記候補マーカーがアトピー性皮膚炎による皮膚の痒みの症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーであり、かつ該候補マーカーが、以下の遺伝子：KDM5D、RBM7、CCDC125、CDKAL1、CERS5、DAD1、EMC2、FAM210A、GBP1、GHITM、HSBP1、IGSF6、LSM1、MOSP2、MXD1、NUDC、NUP58、PDXK、PRDX3、PRKAR1A、PTPN1、SERINC1、SRRM2、及びTM2D1、又はその発現産物である、請求項19又は20記載の使用。
- [請求項26] 前記候補マーカーが皮膚の痒みのVAS (Visual Analog Scaling) スコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度変

化を検出するためのマーカーを選択するための候補マーカーである、請求項 25 記載の使用。

[請求項27] 前記候補マーカーがアトピー性皮膚炎による皮膚の乾燥の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーであり、かつ該候補マーカーが、以下の遺伝子：RPLP0、MRPL23、RPL10A、CNKSR3、ECHS1、GPATCH2、GSR、HTATSF1、MPC2、MRPL42、MRPS22、MRPS24、NDUFS6、NFYC、PHB、RPL22、RPL37A、RPS12、RPS4X、SLC25A3、SLIRP、TBC1D9、TOMM20、TTC14、UBE2K、及びZNF791、又はその発現産物である、請求項 19 又は 20 記載の使用。

[請求項28] 前記候補マーカーが皮膚乾燥のVAS (Visual Analog Scaling) スコアに対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカーを選択するための候補マーカーである、請求項 27 記載の使用。

[請求項29] 前記候補マーカーがアトピー性皮膚炎による顔面部紅斑の症度変化の検出のためのマーカーを選択するための候補マーカーであり、かつ該候補マーカーが、以下の遺伝子：CCDC186、NCOA2、A2ML1、BSPRY、CHAC1、DNAJA1、FCHSD1、IFI27、MAPK13、OSBP2、RXRB、SLC22A23、SPRR2F、ACAT2、AFTPH、CLTB、CPEB4、CTNNBIP1、DNAJA3、DOP1A、FRMPD1、GAN、GDPD3、GJB5、HIP1R、IFFO2、ING4、KPNB1、LRATD2、MED31、NUAK2、PAN3、PDCD6、SASH1、SCNN1G、SDR9C7、SEC61A1、SERPINA9、SMIM5、TINCR、TMED7、TMEM123、TRPC4AP、TUFT1、VCP、及びZFPL1、又はその発現産物である、請求項 19 又は 20 記載の使用。

[請求項30] 前記候補マーカーが顔面部紅斑に係る紅斑インデックスに対応するアトピー性皮膚炎の症度変化を検出するためのマーカーを選択するための候補マーカーである、請求項 29 記載の使用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/043715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C12N 15/11</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/12</i>(2006.01)i; <i>C12Q 1/6813</i>(2018.01)i; <i>C12Q 1/686</i>(2018.01)i; <i>C12Q 1/6869</i>(2018.01)i; <i>C12Q 1/6883</i>(2018.01)i; <i>G01N 33/50</i>(2006.01)i; <i>G01N 33/53</i>(2006.01)i; <i>G01N 33/68</i>(2006.01)i FI: C12N15/11 Z; G01N33/50 P; G01N33/53 M; G01N33/53 D; G01N33/68; C12N15/12; C12Q1/6813 Z; C12Q1/686 Z; C12Q1/6869 Z; C12Q1/6883 Z</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/00-15/90; C12Q1/68-1/6897; G01N33/48-33/98		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2020-74769 A (KAO CORP.) 21 May 2020 (2020-05-21) experiment 6	19-30
A		1-18
Y	WO 2007/046463 A1 (FANCL CORP.) 26 April 2007 (2007-04-26) examples	19-30
A		1-18
Y	JP 2009-511572 A (IEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.) 19 March 2009 (2009-03-19) example 5	19-30
A		1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 07 January 2022		Date of mailing of the international search report 18 January 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/043715

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2010-0078417 A (SAMSUNG LIFE WELFARE FOUNDATION) 08 July 2010 (2010-07-08) claims, table 2	19-30
A		1-18
Y	KR 10-2010-0078418 A (SAMSUNG LIFE WELFARE FOUNDATION) 08 July 2010 (2010-07-08) claims, table 2	19-30
A		1-18
Y	US 2020/0113508 A1 (NATIONAL JEWISH HEALTH) 16 April 2020 (2020-04-16) paragraph [0075]	19-30
A		1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/043715

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2020-74769	A	21 May 2020	WO 2020/091044 A1 CN 112955551 A	
WO	2007/046463	A1	26 April 2007	US 2009/0263792 A1 examples KR 10-2008-0063326 A CN 101292032 A CN 103149367 A CN 103149368 A CN 103175972 A CN 103278641 A HK 1182768 A HK 1182769 A HK 1182770 A	
JP	2009-511572	A	19 March 2009	US 2012/0144504 A1 example 5 JP 2014-1231 A US 2015/0329867 A1 WO 2007/046087 A2 EP 1945244 A2 CA 2626361 A IL 190841 D AU 2006305550 A	
KR	10-2010-0078417	A	08 July 2010	(Family: none)	
KR	10-2010-0078418	A	08 July 2010	(Family: none)	
US	2020/0113508	A1	16 April 2020	WO 2020/081664 A1 p. 31, paragraph [0002]	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12Q 1/6813(2018.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i FI: C12N15/11 Z; G01N33/50 P; G01N33/53 M; G01N33/53 D; G01N33/68; C12N15/12; C12Q1/6813 Z; C12Q1/686 Z; C12Q1/6869 Z; C12Q1/6883 Z</p>																							
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N15/00-15/90; C12Q1/68-1/6897; G01N33/48-33/98</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年													
日本国実用新案公報	1922-1996年																						
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																						
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																						
日本国登録実用新案公報	1994-2022年																						
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2020-74769 A (花王株式会社) 21.05.2020 (2020-05-21)</td> <td>19-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>試験例 6</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2007/046463 A1 (株式会社ファンケル) 26.04.2007 (2007-04-26)</td> <td>19-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>実施例</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2009-511572 A (イエダ リサーチ アンド デイベロップメント カンパニー リミ テッド) 19.03.2009 (2009-03-19)</td> <td>19-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>実施例 5</td> <td>1-18</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	JP 2020-74769 A (花王株式会社) 21.05.2020 (2020-05-21)	19-30	A	試験例 6	1-18	Y	WO 2007/046463 A1 (株式会社ファンケル) 26.04.2007 (2007-04-26)	19-30	A	実施例	1-18	Y	JP 2009-511572 A (イエダ リサーチ アンド デイベロップメント カンパニー リミ テッド) 19.03.2009 (2009-03-19)	19-30	A	実施例 5	1-18
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																					
Y	JP 2020-74769 A (花王株式会社) 21.05.2020 (2020-05-21)	19-30																					
A	試験例 6	1-18																					
Y	WO 2007/046463 A1 (株式会社ファンケル) 26.04.2007 (2007-04-26)	19-30																					
A	実施例	1-18																					
Y	JP 2009-511572 A (イエダ リサーチ アンド デイベロップメント カンパニー リミ テッド) 19.03.2009 (2009-03-19)	19-30																					
A	実施例 5	1-18																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																							
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	"&" 同一パテントファミリー文献	"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献										
* 引用文献のカテゴリー	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																						
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの																						
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの																						
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	"&" 同一パテントファミリー文献																						
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献																							
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献																							
<p>国際調査を完了した日</p> <p>07.01.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>18.01.2022</p>																						
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>竹内 祐樹 4B 5082</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																						

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	KR 10-2010-0078417 A (SAMSUNG LIFE WELFARE FOUNDATION) 08.07.2010 (2010 - 07 - 08) 請求の範囲、表 2	19-30 1-18
Y A	KR 10-2010-0078418 A (SAMSUNG LIFE WELFARE FOUNDATION) 08.07.2010 (2010 - 07 - 08) 請求の範囲、表 2	19-30 1-18
Y A	US 2020/0113508 A1 (NATIONAL JEWISH HEALTH) 16.04.2020 (2020 - 04 - 16) [0 0 7 5]	19-30 1-18

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/043715

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2020-74769	A	21.05.2020	WO	2020/091044	A1	
				CN	112955551	A	
WO	2007/046463	A1	26.04.2007	US	2009/0263792	A1	
				実施例			
				KR	10-2008-0063326	A	
				CN	101292032	A	
				CN	103149367	A	
				CN	103149368	A	
				CN	103175972	A	
				CN	103278641	A	
				HK	1182768	A	
				HK	1182769	A	
				HK	1182770	A	
JP	2009-511572	A	19.03.2009	US	2012/0144504	A1	
				実施例 5			
				JP	2014-1231	A	
				US	2015/0329867	A1	
				WO	2007/046087	A2	
				EP	1945244	A2	
				CA	2626361	A	
				IL	190841	D	
				AU	2006305550	A	
KR	10-2010-0078417	A	08.07.2010	(ファミリーなし)			
KR	10-2010-0078418	A	08.07.2010	(ファミリーなし)			
US	2020/0113508	A1	16.04.2020	WO	2020/081664	A1	
				3 1 頁第 2 段落			