

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-528573

(P2015-528573A)

(43) 公表日 平成27年9月28日(2015.9.28)

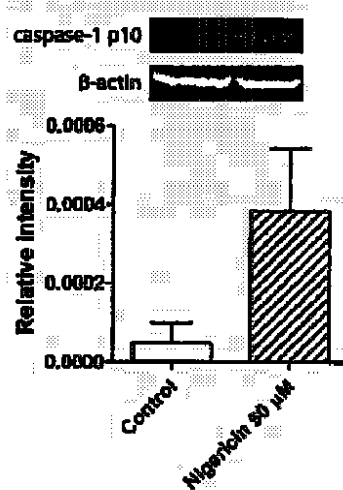
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	2 G O 5 2
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483 C	4 B O 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	4 C 1 6 1
GO 1 N 1/30 (2006.01)	GO 1 N 1/30	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-530160 (P2015-530160)	(71) 出願人	515057908
(86) (22) 出願日	平成25年9月5日 (2013.9.5)		リウ, ジュリア
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月3日 (2015.4.3)		アメリカ合衆国 アーカンソー 7 2 2 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/058296		3, リトル ロック, ミラマー プール
(87) 国際公開番号	W02014/039699		ルバード 4 1 2
(87) 国際公開日	平成26年3月13日 (2014.3.13)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/697, 190		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成24年9月5日 (2012.9.5)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 腸細胞バリア機能不全を検出するための方法および組成物

(57) 【要約】

患者における腸細胞バリア機能不全を検出するための方法が開示される。一方法において、患者の腸上皮細胞 (IEC)、中咽頭上皮細胞 (OEC) もしくは口腔上皮細胞 (BEC) は、カスパーゼ - 1 およびカスパーゼ - 3 & 7 に対して特異的な検出可能なプローブで染色され、上記細胞は、細胞バリア機能不全の指標としてカスパーゼ - 3 & 7 に対するカスパーゼ - 1 マーカーの有意に高い比によって明らかのように、カスパーゼ - 1 の上昇したレベルの存在に関して調べられる。第2の方法において、患者のIEC、OECもしくはBECのインサイチュ画像が、プローブベースの共焦点レーザー内視鏡検査 (pCLE) によって得られ、画像は、細胞ギャップの密度について分析される。腸細胞バリア機能不全を検出するときに使用するためのプローブ組成物もまた、開示される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者における過敏性腸症候群（IBS）もしくは炎症性腸疾患（IBD）を検出するための方法であって、該方法は、

（a）患者の腸上皮細胞、中咽頭上皮細胞、もしくは口腔上皮細胞を、カスパーゼ - 1 インヒビターに結合体化した検出可能なマーカーを有するプローブで染色する工程、および

（b）該染色された腸上皮細胞、中咽頭上皮細胞、もしくは口腔上皮細胞を、該患者の腸上皮細胞、中咽頭上皮細胞、もしくは口腔上皮細胞と関連したカスパーゼ - 1 の正常以上のレベルの証拠として、それぞれ正常な個体に由来する同様に染色された腸上皮細胞、中咽頭上皮細胞、もしくは口腔上皮細胞と比較して上昇したレベルの検出可能なマーカーの存在について試験する工程を包含し、

（c）ここで該患者の腸上皮細胞、中咽頭上皮細胞、もしくは口腔上皮細胞におけるカスパーゼ - 1 の上昇したレベルは、該患者における過敏性腸症候群（IBS）もしくは炎症性腸疾患（IBD）と関連する細胞バリア機能不全の指標である、方法。

【請求項 2】

前記染色する工程は、（i）前記患者から、生検もしくは吸引によって患者の腸上皮細胞を得る工程、および（ii）該細胞をインビトロで染色する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記染色する工程は、（i）前記患者から、歯科生検によって中咽頭上皮細胞を得る工程、および（ii）該細胞をインビトロで染色する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記染色する工程は、（i）前記患者の口腔粘膜スワブから、口腔上皮細胞を得る工程、および（ii）該細胞をインビトロで染色する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記検出可能なマーカーは蛍光性であり、前記試験する工程は、蛍光顕微鏡法、蛍光プレートリーダー、もしくは蛍光フローサイトメトリーによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記染色する工程は、前記検出可能なマーカーを、前記患者の腸内の腸上皮細胞に適用する工程を包含し、および前記試験する工程は、前記染色した細胞を内視鏡で可視化する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記染色する工程は、前記検出可能なマーカーを前記患者の中咽頭内の中咽頭上皮細胞に適用する工程を包含し、前記試験する工程は、前記染色した細胞を、該患者の中咽頭の蛍光検出によって可視化する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記染色する工程は、前記検出可能なマーカーを、前記患者の口内の口腔上皮細胞に適用する工程を包含し、前記試験する工程は、前記染色した細胞を、該患者の口の蛍光検出によって可視化する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記プローブは、テトラペプチド Y V A D と蛍光色素との結合体の口である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記プローブは、構造 Alexa Fluor 488 - G G G G - Y V A D - F M K

10

20

30

40

50

を有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記腸上皮細胞、中咽頭上皮細胞、もしくは口腔上皮細胞を、カスパーゼ - 3 & 7 に対して特異的な第 2 の検出可能なプローブで染色する工程、ならびにカスパーゼ - 1 と関連するマーカー 対 カスパーゼ - 3 & 7 と関連するマーカーの比を決定する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記第 2 のプローブは、カスパーゼ 3 / 7 インヒビター I と蛍光色素との結合体である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

カスパーゼ - 1 マーカー 対 カスパーゼ - 3 & 7 マーカーの比は、IBS もしくは IBD を有する被験体においてよりも健康な被験体において有意に低い、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

カスパーゼ - 1 マーカー 対 カスパーゼ - 3 & 7 マーカーの比は、IBS もしくは IBD を有する被験体においてよりも健康な被験体において少なくとも約 40 % 低い、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

カスパーゼ - 1 の上昇したレベルは、カスパーゼ - 1 インヒビターもしくは抗炎症剤による患者処置の指標として使用される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

患者における腸細胞バリア機能不全を検出する方法であって、該方法は、
プローブベースの共焦点レーザー内視鏡検査 (pCLE) によって患者の IEC のインサイチュ画像を得る工程、
該画像中の IEC を計数して、該画像化した IEC におけるギャップ数を決定する工程であって、ここで細胞 100 個あたり 2 より大きいギャップ数は、細胞バリア機能不全を示す、工程を包含する、方法。

【請求項 1 7】

細胞 100 個あたり 3 より大きなギャップ数は、細胞バリア機能不全を示す、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

100 個あたり約 2 より大きい IEC のレベルは、プロバイオティクス因子による患者処置の指標として使用される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

腸細胞バリア機能不全を検出することにおいて使用するためのプローブ組成物であって、該プローブ組成物は、

(a) カスパーゼ - 1 インヒビターに結合体化した第 1 の検出可能なマーカーを含む第 1 のプローブ、および

(b) カスパーゼ - 3 & 7 インヒビターに結合体化した、該第 1 のマーカーとは異なる第 2 の検出可能なマーカーを含む、第 2 のプローブ、を含む、プローブ組成物。

【請求項 2 0】

前記第 1 のプローブは、前記テトラペプチド Y V A D と蛍光色素との結合体である、請求項 1 9 に記載のプローブ組成物。

【請求項 2 1】

前記第 1 のプローブは、構造 A l e x a F l u o r 488 - G G G G - Y V A D - F M K を有する、請求項 2 0 に記載のプローブ組成物。

【請求項 2 2】

前記第 2 のプローブは、カスパーゼ - 3 / 7 インヒビター I と前記第 1 のプローブ蛍光

10

20

30

40

50

色素のものとは異なる蛍光色素との結合体である、請求項 19 に記載のプロープ組成物。

【請求項 23】

患者におけるクローン病を検出するための方法であって、該方法は、

(a) 患者の中咽頭上皮細胞もしくは口腔上皮細胞を、カスパーゼ - 1 インヒビターに結合体化した検出可能なマーカーを有するプロープで染色する工程、および

(b) 該染色された中咽頭上皮細胞を、該患者の中咽頭上皮細胞と関連したカスパーゼ - 1 の正常以上のレベルの証拠として、正常な個体に由来する同様に染色した中咽頭上皮細胞と比較して上昇したレベルの検出可能なマーカーの存在について試験する工程、を包含し、

(c) ここで該患者の中咽頭上皮細胞におけるカスパーゼ - 1 の上昇したレベルは、クローン病の指標である、方法。

【請求項 24】

前記染色する工程は、(i) 前記患者から、歯科生検によって中咽頭上皮細胞を得る工程、および(ii) 該細胞をインビトロで染色する工程を包含する、請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、過敏性腸症候群 (IBS) および炎症性腸疾患 (IBD) と関連する細胞バリア機能不全を検出するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

過敏性腸症候群 (IBS) は、便通が頻繁であること (bowel frequency)、軟らかさおよび腹部不快感の変化によって特徴付けられる一般的な臨床状態である。Rome II 基準を使用した疫学研究から、IBS の有病率は、北米で 5% ~ 12%、アジアで 1% ~ 22%、および欧州で 1 ~ 8% まで変動することが示されている。女性に多いことが、大部分の研究 (特に、西洋諸国の) において認められる。IBS の主要な要因 (driver) のうちの 1 つは、異常な腸上皮細胞 (IEC) 押し出しであり得る。

【0003】

炎症性腸疾患 (IBD) は、結腸および小腸の一群の炎症状態である。IBD の主なタイプは、クローン病および潰瘍性大腸炎である。IBS および IBD は両方とも、患者における細胞バリア機能不全をもたらす異常な腸上皮細胞 (IEC) 押し出しに起因し得るか、またはそれによって悪化し得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

発明の概要

本発明は一実施形態において、患者における過敏性腸症候群 (IBS) もしくは炎症性腸疾患 (IBD) を検出するための方法であって、該方法は、(a) 患者の腸上皮細胞、中咽頭上皮細胞、もしくは口腔上皮細胞を、カスパーゼ - 1 インヒビターに結合体化した検出可能なマーカーを有するプロープで染色する工程、および (b) 該染色された腸上皮細胞、中咽頭上皮細胞、もしくは口腔上皮細胞を、該患者の腸上皮細胞、中咽頭上皮細胞、もしくは口腔上皮細胞と関連したカスパーゼ - 1 の正常以上のレベルの証拠として、それぞれ正常な個体に由来する同様に染色された腸上皮細胞、中咽頭上皮細胞、もしくは口腔上皮細胞と比較して上昇したレベルの検出可能なマーカーの存在について試験する工程による、方法を包含する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

該患者の腸上皮細胞（ I E C ）、中咽頭上皮細胞（ O E C ）、もしくは口腔上皮細胞（ B E C ）におけるカスパーゼ - 1 の上昇したレベルは、該患者における過敏性腸症候群（ I B S ）もしくは炎症性腸疾患（ I B D ）と関連する細胞バリア機能不全の指標である。

【 0 0 0 6 】

一実施形態において、患者の I E C は、その患者の腸の内層からの生検もしくは吸引によって得られ、蛍光マーカーを用いてインビトロで染色され、蛍光レベルについて分析される。別の実施形態において、患者の O E C は、その患者における中咽頭細胞の歯科生検もしくは吸引から得られ、蛍光マーカーを用いてインビトロで染色され、蛍光レベルについて分析される。第 3 の実施形態において、患者の B E C は、例えば、口腔粘膜（cheek）を穏やかにぬぐうことによって得られ、蛍光マーカーによってインビトロで染色され、蛍光レベルについて分析される。蛍光検出は、蛍光顕微鏡法、蛍光プレートリーダー、フローサイトメトリー、または蛍光レベルを検出および測定するために適した他の方法によってであり得る。

10

【 0 0 0 7 】

別の一般的な実施形態において、O E C もしくは B E C におけるカスパーゼ - 1 の上昇したレベルは、I B D の一つの主なタイプであるクローン病の診断である。

【 0 0 0 8 】

プローブは、カスパーゼ - 1 インヒビター（例えば、テトラペプチド Y V A D ）と蛍光色素との結合体であり得る。例示的なプローブは、構造 A l e x a F l u o r 4 8 8 - G G G G - Y V A D - F M K を有する。

20

【 0 0 0 9 】

例示的な実施形態において、細胞は、（ a ）カスパーゼ - 1 インヒビターと結合体化した第 1 の検出可能なマーカーを含む第 1 のプローブ、および（ b ）カスパーゼ - 3 & 7 インヒビターに結合体化した、上記第 1 のマーカーとは異なる第 2 の検出可能なマーカーを含む第 2 のプローブ、で染色される。上記細胞は、カスパーゼ - 1 と関連（associate）したマーカー 対 カスパーゼ - 3 & 7 と関連したマーカーの比を決定するために分析される。カスパーゼ - 1 マーカー 対 カスパーゼ - 3 & 7 マーカーの比は、I B S もしくは I B D を有する被験体においてよりも健康な被験体において有意に低い、例えば、少なくとも 4 0 % 低い。例示的な第 2 のプローブは、カスパーゼ - 3 / 7 インヒビター I と、ピーク吸収波長および発光波長が上記第 1 のプローブの蛍光色素のものとは異なっている蛍光色素との結合体である。

30

【 0 0 1 0 】

上記方法は、I E C におけるカスパーゼ - 1 のレベルが正常よりも高く、有意に上昇したレベルである場合に、カスパーゼ - 1 インヒビター、抗炎症剤、プロバイオティクス因子もしくはこれらの因子の組み合わせによる患者処置を示すために使用され得る。

【 0 0 1 1 】

別の一般的な実施形態において、上記 I E C 、 O E C 、もしくは B E C は、インサイチュで染色され、プローブベースの共焦点レーザー内視鏡検査法（p C L E ）によって調べられる。

40

【 0 0 1 2 】

他の局面において、本発明は、プローブベースの共焦点レーザー内視鏡検査法（p C L E ）によって患者の I E C のインサイチュ画像を得る工程、および上記画像において I E C を計数して、上記画像化した I E C におけるギャップ数を決定する工程によって、患者における腸細胞バリア機能不全を検出する方法を包含する。細胞 1 0 0 個あたり約 2 より大きなギャップ密度は、細胞バリア機能不全を示し、（例えば、プロバイオティクス因子による）患者処置の指標として使用され得る。

【 0 0 1 3 】

腸細胞バリア機能不全を検出することにおける使用のためのプローブ組成物もまた、開示される。上記組成物は、（ a ）カスパーゼ - 1 インヒビターに結合体化された第 1 の検

50

出可能なマーカーを含む第1のプローブ、および(b)カスパーゼ-3/7インヒビターに結合体化された、上記第1のマーカーとは異なる第2の検出可能なマーカーを含む第2のプローブ、を含む。上記第1のプローブは、テトラペプチドYVADと蛍光色素との結合体(例えば、構造A1exa Fluor 488-GGGG-YVAD-FMKを有するプローブ)であり得る。上記第2のプローブは、カスパーゼ-3/7インヒビターIと上記第1のプローブにおけるものとは異なる蛍光色素との結合体であり得る。

【0014】

本発明のこれらおよび他の目的および特徴は、以下の発明の詳細な説明を添付の図面とともに読めばより完全に明らかになる。

【図面の簡単な説明】

10

【0015】

【図1】極性化したT84単層におけるIEC誘発性細胞押し出しのカスパーゼ-1活性化。(a)ニゲリシン(nigericin)処理(50 μ M)した培養T84細胞における活性化カスパーゼ-1の代表的FLICA 1染色(緑色)。赤色、ZO-1染色;青色、DAPI、緑色、FLICA 1染色(スケールバー50 μ m)。(b)ニゲリシン処理(50 μ M)したT84細胞における増大した活性カスパーゼ-1(p10)発現。(c)ニゲリシンで処理したT84細胞のTEM像:核膜の周りのクロマチン凝集、細胞質中の濃密体を有する小さなおよび大きな透明液胞、ならびにマトリクス密度の増大を伴う無傷のミトコンドリア。A、頂端表面;B、基底表面;N、核(スケールバー2 μ m)。

20

【図2】カスパーゼ-1活性化後の極性化した単層の変化した透過性。(a)Ac-YVAD-CMK(ニゲリシン 25 μ Mにおいて)で逆転した、ニゲリシンで処理したT84単層のTERにおける用量依存性低下($\pm$ S.D.)。(b)ニゲリシンで処理したT84単層をECISによって測定した場合の、Ac-YVAD-CMKで逆転した(ニゲリシン 25 μ Mにおいて)、TERにおける時間依存性低下。(c)ニゲリシン 10 μ Mで一晩処理した単層を横断するFluoresbrite(登録商標)YGミクロスフェアおよびE.coli TMW2.497の動き。赤色、ZO-1染色;中央画像緑色、1 μ m ミクロスフェア;右側画像緑色、E.coli TMW2.497(スケールバー50 μ m)。データは、3回の独立した実験の代表である。* $P < 0.05$ 。

【図3】WTマウスと比較してIL-10 KOにおいて増大したカスパーゼ-1活性化。(a)ウェスタンブロット分析によるIL-10 KOにおいて増大した活性カスパーゼ-1(p10)発現。(b)IL-10 KO(N=5)の腸組織において増大した活性IL-1 β 。(c)WTマウスおよびIL-10 KOマウスに由来するPCNA染色した腸切片の代表画像(スケールバー50 μ m)。(d)齧歯類の腸組織の陰窩1つあたりの陽性のPCNA染色細胞の数。* $P < 0.05$ 。

30

【図4】IL-10 KOマウスにおける管腔の微粒子および微生物への増大した透過性。(a)血液サンプル(N=4)への経口投与したFITC-デキストランの透過性。(b)血液サンプル(N=6)中の経口投与した0.5 μ m Fluoresbrite(登録商標)ミクロスフェアの存在。(c)肝臓および脾臓(N=4)へのE.coli TMW2.497の移動。(d)マウス腸において押し出しゾーンに入っているE.coli TMW2.497の代表画像。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

40

【図5】IEC押し出しおよびインビボでのミクロスフェアの透過に関するカスパーゼ-1の調節。(a)共焦点内視鏡検査法を使用して上皮ギャップ密度を経時的に測定した場合の、IL-10 KOマウスにおけるIEC押し出しに関するAc-YVAD-CMK 10mg/kgでの処置(N=5)。(b)IL-10 KOマウスの血液サンプル(N=6)中の経口投与した0.5 μ m Fluoresbrite(登録商標)ミクロスフェアの存在。(c)ギャップ密度によって測定した場合の、WTマウス(N=3)におけるIEC押し出しに関する1日についての0.33mg/kgのP.aeruginosa IV型ピリ線毛の強制経口投与(orogavage)。* $P < 0.05$ 。

【図6】患者におけるIECのカスパーゼ-1およびカスパーゼ-3&7の活性化。(a

50

）粘膜生検サンプルの代表的な活性化カスパーゼ - 1 およびカスパーゼ - 3 & 7 染色。白抜き矢尻は、陽性染色された I E C を示す（スケールバー 50 μ m）。（b）コントロール患者（N = 3）および I B D 患者（N = 3）の粘膜生検サンプル中の上皮細胞総数に対して正規化した F L I C A 1 もしくは 3 & 7 染色細胞（ $\pm$ S . D .）。（c）I B D 患者の管腔吸引物から調製された細胞学的ブロック（c y t o l o g y b l o c k）に由来する代表的な上皮細胞および免疫細胞（H & E 染色、倍率 400 $\times$ ）。（d）コントロール患者（N = 7）および I B D 患者（N = 11）の管腔吸引物中の押し出された I E C の数（ $\pm$ S . D .）。（e）管腔吸引物中のカスパーゼ - 3 & 7 陽性の押し出された細胞に対する活性化カスパーゼ - 1 の比。* P < 0 . 0 5。

【図 7】無症候性コントロール患者（N = 3）および I B D 患者（N = 3）の粘膜組織における活性化カスパーゼ 1 および I L - 1 β 発現。（a）E L I S A によって測定した場合の、コントロール患者と比較して I B D において増大した活性 I L - 1 β 発現。（b）I B D 患者の回腸末端部における活性 I L - 1 β の増大した発現を確認するウェスタンブロット分析。（c）ウェスタンブロット分析による、I B D 患者において増大した活性カスパーゼ - 1（p 10）発現。* P < 0 . 0 5。

【図 8】上皮細胞およびギャップを計数するために使用される、患者由来の回腸末端部の代表的 p C L E 画像。この画像中でギャップは認められなかった。白抜き矢印は、細胞の計数で使用する個々の上皮細胞を示す。

【図 9】患者の回腸末端部の p C L E 画像。a）健康なコントロール患者（左）および I B S を有する患者（右）の回腸末端の代表的画像。粘膜固有層および絨毛の管腔が標識される。白抜きの矢尻は、上皮内層において非常に密な領域として現れる 2 つの隣り合う上皮ギャップを示す。b）コントロール患者の分析に使用される 3 つの連続した p C L E 画像。c）I B S 患者の分析に使用される 3 つの連続した p C L E 画像。スケールバー：20 μ m。

【図 10】コントロール患者および I B S 患者の回腸末端部における上皮ギャップ密度の比較（メジアン $\pm$ 四分位数範囲）。上皮ギャップ密度は、計測した細胞 1000 個あたりの上皮ギャップ数として表される。* は、p < 0 . 001 を示す。

【図 11】図 11 は、ウェスタンブロット分析によって決定した場合の、正常な患者およびクローン病患者での歯科生検由来の中咽頭上皮細胞におけるカスパーゼ - 1 発現のレベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

（発明の詳細な説明）

A . カスパーゼ - 1 染色によって細胞バリア機能不全を検出する方法

A 1 . カスパーゼ - 1 媒介性 I E C 押し出しは、上皮単層の破れ目を生じる

【0017】

カスパーゼ - 1 誘発性 I E C 押し出しの形態を調査するために、本発明者らは、ニゲリシン（十分に確立された N l r p 3 依存性インフラマソーム活性化因子）を極性化された T 8 4 単層に適用した。F L I C A 1 染色を使用して、本発明者らは、処理後 3 時間で単層において増大した活性化カスパーゼ - 1 および細胞押し出しを観察した（図 1 a）。ニゲリシン処理 T 8 4 細胞における活性カスパーゼ - 1 発現を、ウェスタンブロット分析によって確認した（図 1 b）。走査型電子顕微鏡法（T E M）による単層から押し出された細胞の形態学的外見から、核における明瞭なクロマチン凝集、無傷のミトコンドリアおよび細胞質中の小さなもしくは大きな透明な液胞が明らかになった（図 1 c）。

【0018】

細胞押し出しのこの形態がバリア機能の喪失を生じるか否かを決定するために、本発明者らは、経上皮電気抵抗（T E R）を測定した。ニゲリシン曝露後に、用量依存性バリア機能不全が発生し、これは、3 時間で（図 2 a）および一晩の処理後（図 2 b）に、選択的で強力かつ不可逆性のカスパーゼ - 1 インヒビター A c - Y V A D - C M K での予備処理によって排除された。T 8 4 単層における破れ目が T E M 画像上、直径 1 ~ 2 μ m であ

10

20

30

40

50

と思われると仮定すると、本発明者らは、最低用量のニゲリシン処理を使用して、微粒子 (1 μm Fluoresbrite (登録商標) ミクロスフェア) および微生物 (E. coli TMW2.497) に対する上皮完全性を評価した。Transwellの上側のチャンバから単層を通して下側のチャンバへのミクロスフェアおよびE. coliの移動が観察された (図2c)。FluoresbriteミクロスフェアおよびE. coli TMW2.497を、基底側面のウェルの培地中で回収した。

【0019】

A2. インビボでの細胞押し出しおよび上皮完全性に関するカスパーゼ - 1 の調節

インビボでの腸の透過性に対するカスパーゼ - 1 誘発性IEC押し出しの効果を理解するために、本発明者らは、129/SvEv (WT) マウスと比較して、(上皮ギャップの増大した密度によって測定される場合の) IL - 10 KOにおいて認められた増大した細胞押し出しが、増大したカスパーゼ - 1 活性化に起因するか否かを最初に試験した。IL - 10 KOマウスの小腸における活性カスパーゼ - 1 発現の増大は、ウェスタンブロット分析 (図3a) で認められ、ELISAによる増大した活性IL - 1 β 発現 (図3b) とともに確認された。IL - 10 KOにおける低下した細胞増殖が、観察された上皮ギャップ密度の差異に寄与したか否かを決定するために、本発明者らは、2種類のマウス系統に由来する腸サンプルをPCNAで染色した。IL - 10 KOは、WTマウスと比較して、細胞増殖において38%低下を有した (図3cおよび図3d)。

【0020】

腸の透過性に対する増大したIEC押し出しの効果を、IL - 10 KOマウスおよびWTマウスにおいて、高分子 (デキストラン) および微粒子 (Fluoresbrite (登録商標) ミクロスフェア) の血液への透過、ならびに肝臓および脾臓への微生物 (E. coli TMW2.497) の移動に関して調査した。増大したIEC押し出しは、血液へのデキストラン (図4a) および0.5 μm ミクロスフェア (図4b) の増強された透過、ならびに組織培養によって決定した場合のE. coliの移動 (図4c) と関連した。GFP標識E. coliを強制投与したマウスに由来する回腸組織を共焦点顕微鏡法で検鏡すると、IL - 10 KOの腸における押し出しゾーン付近に細菌が存在していることが明らかになった (図4d)。

【0021】

インビボでのIEC押し出しに対するカスパーゼ - 1 阻害の効果を経時的に評価するために、本発明者らは、選択的カスパーゼ - 1 インヒビターAc - YVAD - CMK (10 mg / kg) で4日間、7日間および10日間 (齧歯類腸細胞の平均寿命の5倍⁴⁰) にわたって腹腔内注射によってIL - 10 KOマウスを処置した。コントロールIL - 10 KO群には、等容積の2% (v / v) DMSOを10日間与えた。上皮ギャップ密度の低下によって測定した場合に、IEC押し出しの時間依存性低下が、YVADで処置したIL - 10 KOマウスで生じた (図5a)。ギャップ密度の低下は、7日目に、強制経口投与した (orogavaged) 0.5 μm 不活性ラテックスミクロスフェアの血液への透過を正規化することを伴った (図5b)。

【0022】

IEC押し出しおよび上皮完全性に対するカスパーゼ - 1 活性化の効果を、P. aeruginosa IV型ピリ線毛 (カスパーゼ - 1 活性化を誘発するために経口で与えられ得るICEプロテアーゼ活性化因子 (IPAF) インフラマソームアクチベーター) の投与を用いて試験した。ニゲリシンは経口投与できず、顕著な全身毒性と関連したので、本発明者らはP. aeruginosa IV型ピリ線毛を選択した。IV型ピリ線毛 (0.33 mg / kg) を1日間強制経口投与したWTマウスにおいて、本発明者らは、等容積の食塩水を経口投与したコントロールマウス (図5c) と比較して、より高い上皮ギャップ密度によって測定した場合に、IEC押し出しの増大に向かう傾向を認めた。

【0023】

A3. ヒト腸における非アポトーシス性のIEC押し出しは、カスパーゼ - 1 活性化によって媒介される

10

20

30

40

50

I E Cのカスパーゼ - 1 活性化がヒトにおける細胞押し出しの主要な機構を代表するかどうかを調査するために、本発明者らは、I B D患者および無症候性コントロール患者の正常に見える回腸末端部から、粘膜生検物および管腔吸引物を集めた。粘膜生検サンプルを、F L I C A - 1 および3 & 7で染色して、活性化カスパーゼ - 1 染色（ピロトースシ性）もしくはカスパーゼ - 3 & 7 染色（アポトースシ性）に対して陽性のI E Cを同定した（図6 a）。コントロールにおける陽性染色されたカスパーゼ - 1 細胞 対 カスパーゼ - 3 & 7 細胞の比は、1 . 1 6 : 1であった；これは、I B D患者では1 . 7 : 1に増大していた（図6 b）。管腔吸引物の分析に関しては、コントロール患者は、細胞学的ブロック（c y t o l o g y b l o c k）調製のための材料を不十分にしか有しなかった。I B D患者では、細胞学的ブロックで見られた有核細胞の総数は、1 2 ~ 1 5 5 個の細胞に及び、I E Cは、上記細胞のうちの4 1 ~ 1 0 0 %を占めた（図6 c）。本発明者らは、フィルター上に集められた管腔吸引物中の押し出された細胞の総数を定量した：コントロール患者と比較してI B D患者由来の管腔吸引物では、有意により多い細胞数が認められた（図6 d）。押し出された細胞および細胞破片を、活性化カスパーゼ - 1 および3 & 7に関してF L I C Aで染色した。F L I C A染色した管腔吸引物の画像を、組織サンプルに使用される等級付けスケールと同様に、2つの膜上に存在する細胞および細胞破片のカスパーゼ染色の強度に基づいてスコア付けした。各画像に、染色強度および染色された細胞もしくは細胞破片の数に応じて、スコア0 ~ 4を割り当てた。このスコア付けシステムを使用して、コントロールにおける陽性染色されたカスパーゼ - 1 細胞 対 カスパーゼ - 3 & 7 細胞の比は、約1 : 1であった。これは、I B D患者では2 : 1へと増大した（図6 e）。

10

20

【0024】

粘膜生検サンプル中の活性I L - 1 β の発現をE L I S Aで測定したところ、I B D患者において有意に高かった（図7 a）。粘膜生検サンプルにおける活性カスパーゼ - 1 およびI L - 1 β の増大した発現は、ウェスタンブロット分析で確認された（図7 bおよび図7 c）。まとめると、これら結果は、カスパーゼ - 1 活性化が健康なヒトの腸におけるI E C押し出しの重大な機構を表し、I B D患者において認められる細胞押し出しにおける増大の大部分の原因であると思われることを示唆する。この研究では、本発明者らは、インビトロおよびインビボで上皮の破れ目をもたらす、カスパーゼ - 1 活性化によって媒介されるI E C押し出しの炎症形態を記載した。I E C押し出しのこの形態は、極性化した単層を横断する微粒子および微生物の移動を可能にした。齧歯類の腸におけるI E C押し出しは、カスパーゼ - 1 酵素の活性化もしくは阻害によって調節され得る。I L - 1 0 K Oマウスにおける増大したI E C押し出しは、高分子（デキストラン）、微粒子の増大した透過および共生細菌の移動と関連した。インビボでのカスパーゼ - 1 活性の調節は、I E C押し出しの変化とともに、不活性なラテックスミクロスフェアの透過によって測定される場合、上皮完全性における付随する変化を生じた。患者において、カスパーゼ - 1 媒介性I E Cの脱落は、健康な患者およびI B D患者の小腸において観察され得るが、I B D患者ではその増大が顕著であった。本発明者らの実験結果は、上皮完全性を損なうと以前に報告された⁷ I E C押し出しの根底にある機構に根本的な新たな見識を提供する。

30

40

【0025】

ピロトースシおよびアポトースシの特徴を有する押し出された細胞を示す十二指腸吸引物の以前の形態分析と一致して、本発明者らの管腔吸引物研究から、押し出された細胞におけるカスパーゼ - 1 およびカスパーゼ - 3 & 7の両方の活性化が明らかになった。本発明者らの粘膜生検分析の知見は、ヒト腸標本の活性化カスパーゼ - 3 染色を使用して、脱落したI E Cのうちの4 4 %でアポトースシが見いだされた以前の研究と一致している。この研究では、本発明者らは、押し出されているI E Cのうちの4 6 %でカスパーゼ - 3 & 7 活性化を認めた。

【0026】

患者由来の押し出された細胞および生検サンプルの本発明者らの分析結果は、補完的か

50

つ首尾一貫しており、押し出されたIECの以前の研究とも一致している。管腔吸引物分析は、押し出されたIECが脱落后に断片へと分解し得るので、粘膜生検分析結果は、カスパーゼ-1陽性細胞およびカスパーゼ3 & 7陽性細胞の相対比を確認するために必須であったという事実によって制限され得る。カスパーゼ-1媒介性細胞押し出しゾーンは微生物に対して透過性であり得るので、IBD患者におけるその劇的な上昇は、以前の研究で認められた増大した粘膜内およびリンパ節関連細菌負荷に寄与し得る。患者におけるバリア機能は、現在の研究では試験されなかった。上皮の欠陥が微粒子および微生物の侵入を許すようであるので、上皮完全性を調べるための患者における適切な試験は、厳格な検証研究を要する。さらに、本発明者らは、観察された上皮完全性の喪失を定義するために重要なカスパーゼ-1媒介性細胞脱落后の押し出しゾーンの終結機構も回復機構も調査しなかった。アポトーシス誘発性細胞押し出しにおいて、周りの細胞の収縮およびタイトジャンクションの再組織化は、バリア機能の喪失を防止するために必要とされる。ピロトーシスにおける細胞脱落プロセスの生化学的事象を詳細に示すためのさらなる研究は、タイトジャンクション調節、押し出しに関与する収縮タンパク質、および細胞押し出しのこの形態における終結機構の役割の我々の理解を促進する。カスパーゼ(caspase)-1媒介性細胞押し出し後の終結機構の基本的な理解は、適切な試験の開発を促進して、患者における上皮完全性を評価するために必要とされ得る。

10

【0027】

透過型顕微鏡法(TEM)による押し出された細胞の形態的な外見は、ピロトーシス細胞の以前の報告と一致し(図1c)、ヒトにおける損なわれた上皮完全性と関連したIEC押し出しの形態の説明に合う。TER研究結果は、細胞押し出しのこの形態によって誘発される上皮内層における破れ目がカスパーゼ-1依存性であることを示唆する。本発明者らのデータは、カスパーゼ-1活性化から生じる細胞押し出しゾーンが管腔の微生物および抗原の侵入部位を提供し得ることをさらに示唆する。微生物侵入の部位としての細胞内空間は、代謝的ストレスを受けている上皮において、ならびに腸細胞、単球および樹状細胞の三次元共存培養システムにおいて、観察された。ここで、本発明者らは、IECのみでのインフラマソーム/カスパーゼ-1活性化を有する上皮における類似のバリア欠損の発生を観察した。

20

【0028】

齧歯類モデルでは、カスパーゼ-1活性の調節は、上皮内層の完全性における関連した変化とともに、IEC押し出しを変化させた。上皮のバリア機能が保存されるアポトーシス媒介性細胞押し出しと比較したところ、本発明者らは、ピロトーシス媒介性IEC押し出しが粘膜への微生物および微粒子の進入に好都合な上皮の破れ目を導入することを見いだした。P. aeruginosaのIV型ピリ線毛での一晚処理を伴うピロトーシスの誘発は、WTマウスにおいてミクロスフェアの透過の増大を付随する、より高いIEC押し出しを生じた。逆に、IL-10 KOマウスにおけるカスパーゼ-1活性の阻害は、上皮ギャップ密度によって測定した場合に、IEC押し出しの時間依存性低減を生じた。これら観察に基づいて、本発明者らは、大腸炎の定常状態の薬理学的活性(半減期の5倍)を達成する時間が、IL-10 KOマウスに関しては約35日間であると概算した。従って、本発明者らは、低減した細胞押し出しの生理学的効果を研究するために、通常の臨床エンドポイント(大腸炎スコアにおける改善)ではなく、強制経口投与したラテックスミクロスフェアの透過(代理エンドポイントとしての上皮完全性の評価)を使用することを選択した。本発明者らの研究において、強制投与したミクロスフェアの透過の正規化を、7日間の処置の後に行った。

30

40

【0029】

IL-1βの上流で、Nlrp3は、免疫細胞および上皮細胞の両方で発現され、腸のホメオスタシスにおいて重要な役割を果たすようである。Nlrp3-/-マウスは、DSS、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホネート(TNBS)、もしくはCitrobacter rodentium感染によって誘発される実験的大腸炎により罹りやすい。以前の研究と一致して、本発明者らの結果は、Nlrp3もしくは他の経路のいずれ

50

かによって媒介されるカスパーゼ - 1 活性化誘発性 I E C 押し出しが、健康上、腸のホメオスタシスに非常に重要であり得ることを示す。カスパーゼ - 1 活性化から生じる I L - 1 β および I L - 1 8 生成は、いくつかの報告において腸の炎症に寄与することが示された。その一方で、より近年の研究から、カスパーゼ - 1 が大腸炎および大腸炎関連がんに対する保護を与えたことが示唆される。実験結果の矛盾は、遺伝的バックグラウンドにおける差異、使用される動物の性別、もしくは動物施設の微生物叢の変動に一部起因し得る。

【 0 0 3 0 】

まとめると、本発明者らの研究結果は、I E C のカスパーゼ - 1 活性化が、粘膜への微生物侵入に都合がよいと思われる腸上皮のバリア機能不全の発生に寄与する細胞押し出しを誘発し得ることを示す。細胞押し出しのこの形態は、上皮内層に破れ目を導入すると以前に観察された脱落事象の原因となる機構であるようである。

10

【 0 0 3 1 】

A 4 . O E C および B E C において上昇したカスパーゼ - 1 レベルは、クローン病の診断である。

O E C のカスパーゼ - 1 活性化がクローン病の診断であるか否かを決定するために、本発明者らは、標準的手順を使用して、正常個体およびクローン病個体の中咽頭領域の齒科生検物を得た。生検で得られた上皮細胞を、上記のように、カスパーゼ - 1 マーカーを用いてインビトロで染色し、蛍光顕微鏡法によって検鏡して、カスパーゼ - 1 レベルを決定した。図 11 における棒グラフから認められるように、クローン病患者におけるカスパーゼ (c a p a s e) - 1 レベルは、正常レベルの約 2 倍に上昇した。

20

【 0 0 3 2 】

データは、染色した O E C のインビトロ検出によってヒトにおけるカスパーゼ - 1 レベルをアッセイすることが、クローン病を検出する単純な方法を提供することを実証する。O E C を必要とする診断法は、B E C (例えば、穏やかな口腔粘膜スワブによって得られる)で行われ得、他の I B D および I B S 状態にも適用可能であり、O E C もしくは B E C のインビボ染色、続いて、例えば、口腔での染色した細胞の蛍光レベルを決定するための X 線透視ツールを使用して、インサイチュでの検出によって行われ得る。

【 0 0 3 3 】

B . p C L E による細胞バリア機能不全を検出する方法

30

合計 35 名の患者 (I B S を有する 17 名および 18 名のコントロール) を研究に採用し、I B S を有すると考えられた 1 名の患者を、大腸生検での顕微鏡的大腸炎 (m i c r o s c o p i c c o l i t i s) の存在に起因して、さらなる分析から排除した。ベースラインの患者特徴を、表 1 に示す。16 名の I B S 患者の平均年齢は、 42.8 ± 18.5 歳であった。7 名の女性患者および 9 名の男性患者がいた。コントロール患者 (n = 18) は、平均年齢 47.4 ± 10.1 歳であり、10 名の女性患者および 8 名の男性患者がいた。コントロールにおける結腸内視鏡検査の適応症は、結腸直腸がんスクリーニング (n = 9) および直腸出血もしくは便潜血検査陽性 (n = 9) であった。I B S 群は、12 名の下痢型 I B S 患者および 4 名の便秘型 I B S を含んでいた。彼らの症状の他の原因の評価に関しては、本発明者らは、全ての患者に対して詳細な病歴を訊いて、ラクトース / フルクトース不耐症を排除した。1 名の下痢型 I B S 患者を除く他のすべての患者については、血清抗体 (抗 t T G もしくは抗筋内膜抗体) もしくは生検を伴う E G D を行って、セリアック病を除外した。血清検査も E G D も行わなかった 1 名の患者は、セリアック病の低リスク群にいた。2 名の患者を除く他のすべての患者については、血清 T S H をチェックして、彼らの症状の原因として甲状腺機能障害を排除した。通常の大腸内視鏡検査は、I B S 患者およびコントロール患者の両方における最も一般的な内視鏡検査所見であった。他の所見は、ポリープ (n = 8)、憩室症 (n = 4) および痔 (n = 8) であった。全ての I B S 患者およびコントロールで行った回腸末端部および結腸のランダム生検は、正常範囲内であった。計数において使用した 3 連続の視野でのコントロール患者および I B S 患者の代表的な p C L E 画像を、図 2 に示す。

40

50

【0034】

I B S 患者は、コントロールと比較して有意に高いギャップ密度を有した（図3）：コントロールについて細胞1000個あたり6つ（0～13）のギャップに対して、I B S 患者のメジアンギャップ密度は、細胞1000個あたり32（17～42）個のギャップであった（ $p < 0.001$ ）。ギャップ密度値は正規分布ではなかった（ $p = 0.005$ 、Shapiro-Wilk検定）ので、本発明者らは、メジアン回帰分析を使用して、群間の差異を定量した。I B S とコントロールとの間のギャップ密度における概算のメジアン差異は、細胞1000個あたり26（95% CI：12, 39）個のギャップであった。年齢および性別を調整しても、メジアンギャップ密度値は、細胞1000個あたり25（95% CI：18, 32）個のギャップという概算のメジアン差異を伴って、コントロール群と比較してI B S 群で有意により高いままであった（ $p < 0.001$ ）。

10

【0035】

本発明者らは、性別、年齢、およびI B S のサブタイプに関して上皮ギャップ密度の関係を調べた。コントロール患者では、本発明者らは、 -0.43 というSpearmanの相関係数（ p ）（ $p = 0.07$ ）で上皮ギャップ密度と年齢との間の負の相関に向かう傾向に注目した。さらに、本発明者らは、男性と比較して、女性においてより高いメジアンギャップ密度に向かう傾向を見いだした（細胞1000個あたり0個のギャップに対して11個のギャップ、 $p = 0.07$ ）。I B S 患者では、これら傾向が認められなかった。I B S のサブタイプに関しては、下痢型I B S を有する患者（ $n = 12$ ）は、便秘型I B S 患者（ $n = 4$ ）と比較して、類似のメジアンギャップ密度を有した：それぞれ、細胞1000個あたり32個のギャップと38個のギャップ。

20

【0036】

健康なコントロール群からのギャップ密度値の概算90パーセンタイルは、細胞1000個あたり30個のギャップであった。異常なギャップ密度に関するカットオフとして細胞1000個あたり30個のギャップを使用すると、I B S のギャップ密度の診断感度は62%であり、特異度は89%である（陽性的中率83%および陰性的中率73%）。I B S に関するギャップ密度の診断精度を表2に示す。

【0037】

この研究では、本発明者らは、I B S 患者が、pCLEによって測定した場合に、健康なコントロールと比較して、回腸末端部における上皮ギャップの有意により高い密度を有することを見いだした。この知見は、I B S 患者の腸において上昇した上皮ギャップ（小腸において増大した上皮細胞押し出しの代理マーカー）が、I B S において以前報告されたバリア機能不全および低グレードの粘膜炎症に寄与し得ることを示唆する。本発明者らの結果は少数の患者に基づいているものの、それは、疾患の病因への潜在的な機械論的見識を提供する。

30

【0038】

I B S において増大した腸透過性が上皮のタイトジャンクションの変化およびサイトカインプロファイルの変化と関連するという証拠は増えつつある。タイトジャンクションタンパク質（クローディン-1およびオクルディンを含む）の変化した発現および細胞分布が、I B S 患者で報告された。サイトカインプロファイルの変化は、I B S 患者において増強した腸透過性という概念をさらに裏付ける。本発明者らの研究の知見は、増大した上皮細胞押し出しがI B S 患者において認められるバリア機能不全および粘膜炎症に関する潜在的機構であり得ることを示す。

40

【0039】

本発明者らの二次的な分析では、本発明者らは、女性のコントロール患者が男性より高いギャップ密度に向かう傾向を有することを見出した。この知見は、女性におけるI B S のより高い有病率のあり得る説明を提供し得る。ベースラインでのより高い上皮ギャップがあることから、女性は、疾患をより発症しやすい。さらに、本発明者らは、健康なコントロールにおいて、ギャップ密度と年齢との負の相関という傾向を観察した。これは、これまで報告されていない。これらの知見は、より大規模な研究においてさらに調査される

50

べきである。本発明者らは、下痢型 I B S と便秘型 I B S との間の上皮ギャップ密度における差異を観察しなかった。しかし、この研究に含めたのは、便秘型 I B S を有するわずか 4 名の患者であった。下痢型 I B S 患者の腸透過性の有意な変化は以前に報告されており、便秘型 I B S 患者では報告されていない。

【 0 0 4 0 】

これまでに、I B S を健康な患者から鑑別し得る具体的な内視鏡検査による所見はない。現在、I B S 患者のうちの最大で 5 0 % までが彼らの評価の間に結腸内視鏡検査を受けているが、米国で I B S 関連症状のために行われたのは、結腸内視鏡検査のうちの 2 5 % である。大部分の結腸内視鏡検査は、他の下痢の原因（例えば、顕微鏡的大腸炎）を除外するために行われる。本発明者らの研究では、I B S 患者および健康なコントロール患者の小腸における上皮ギャップを位置決めおよび定量するために慣用的な結腸内視鏡検査の間に p C L E を使用して、本発明者らは、I B S 患者が上皮ギャップの有意により高い密度を有することを実証できた。小腸において増大した上皮ギャップの本発明者らの知見は、I B S の病因の可能性のある機構のみならず、上記疾患の診断の考えられる内視鏡検査による基準をも提供する。この研究において、上昇したギャップ密度は、I B S の診断に関して感度 6 2 % および特異度 8 9 % を有した。I B S 病因の本発明者らの理解が進んだので、p C L E は、この複雑な疾患グループをさらに定義し得る別の診断試験であり得る。ギャップ密度は、本発明者らの現在の研究においてコントロールと比較すると I B S 患者において有意により高いが、ギャップ密度の増大は、本発明者らの以前の報告での I B D 患者と比較すると遙かにより低い。コントロール患者、I B S 患者および I B D 患者におけるギャップ密度の比較は、補足図 1 に示される。

10

20

【 0 0 4 1 】

本発明者らの研究には多くの制限がある。これは、共焦点レーザー内視鏡検査および上皮ギャップの定量の専門技術を有するたった 1 箇所の三次医療機関での 3 4 名の患者という小規模研究である。本発明者らの研究における I B S 患者は、不均一な患者群を示す。本発明者らは、研究の被験体を下痢型 I B S 患者にも便秘型 I B S 患者にも限定しなかった。研究の目的は、I B S 患者とコントロール患者との間のギャップ密度における任意の差異を同定することであった。p C L E 画像を使用した上皮ギャップおよび細胞の定量には誤差があった可能性がある。しかし、評価者は手順の表示については盲検であったので、これら誤差は、I B S 患者とコントロール患者との間で等しく分布したはずである。本発明者らの現在の研究の予備的な知見を確認するためには、さらに大きな多施設研究が必要とされる。この研究では、本発明者らは、上皮ギャップ密度を定量するために小腸を p C L E で画像化したのみであった。本発明者らは、齧歯類モデルを使用して、回腸末端部の上皮ギャップ密度の観察者間変動性および観察者内変動性を特徴付ける確証研究を以前に行った。本発明者らは、結腸の C L E 画像化のこのような確証研究を認識していない。

30

40

【 0 0 4 2 】

結論として、本発明者らは、回腸末端部の上皮ギャップ密度が、結腸内視鏡検査の間に p C L E によって決定した場合に、健康なコントロールより I B S 患者において有意により高いことを示した。この知見は、上皮ギャップ密度によって測定した場合に増大した上皮細胞押し出しが、I B S 患者において認められる変化した腸透過性の考えられる機構を表し得ることを示唆する。

【 0 0 4 3 】

C 1 . 実験 : カスパーゼ - 1 の方法

マウス

少なくとも 1 0 世代にわたって本発明者らの動物施設で交配した、2 4 ~ 2 8 週齢の間の I L - 1 0 K O マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r i e s , B a r H a r b o r , M a i n e) およびバックグラウンド 1 2 9 / S v E v マウス (T a c o n i c F a r m s I n c . , C a m b r i d g e C i t y , I n d i a n a) を、全ての実験に使用した。マウスを従来の明暗サイクルの飼育施設の中で飼育した。動物プロトコルは、U n i v e r s i t y o f A l b e r t a の A n i m a l C a r e

50

and Use Committee for Health Sciencesによって承認された。

【0044】

患者サンプル

研究プロトコルは、University of Albertaのthe Human Ethics Research Review Boardによって検討および承認され、その研究は、ClinicalTrial.gov (NCT00988273)で登録された。結腸内視鏡検査を受ける患者は、上記研究に参加する書面によるインフォームドコンセントを提供した。結腸内視鏡検査を受けるIBD患者 (N = 11、6人のクローン病患者、5人の潰瘍性大腸炎患者) および無症候性コントロール患者 (N = 8) において、正常に見える回腸末端部からの管腔吸引物を、以前に記載された方法⁷を使用して0.9% NaCl溶液で腸表面を穏やかに洗浄した後に集め、直ぐに (< 15分) 分析した。細胞学的ブロックを、食塩水洗浄後に集めた25mLの管腔吸引物から調製し、上皮細胞もしくは免疫細胞の形態同定のために、ヘマトキシリンとエオシンで染色した。FLICA染色のために、吸引液のうちの5mLに由来する細胞を、5.0μm 孔径を有する25mmポリカーボネートMembrane-film Nucleopore膜 (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) 上に、真空濾過を使用して固定化し、0.5% (w/v) BSAを含むさらに20mLのPBS (pH 7.4) の濾過によって洗浄した。蛍光活性な部位特異的不可逆的インヒビター特異的活性化カスパーゼ-1およびカスパーゼ-3 & 7 (カルボキシフルオレセインFLICAアポトーシス検出キット; Immunochemistry Technologies LLC, Bloomington, MN) を使用して、Nucleopore膜上で吸引した細胞を直接染色した。固定化した吸引細胞を有する膜を、半分にカットし、FAM-YVAD-FMK (FLICA-1) 染料の1:700希釈物で染色して、活性化カスパーゼ-1を検出するか、またはFAM-DEVD-FMK (FLICA-3 & 7) 染料の1:700希釈物で染色して、活性化カスパーゼ-3 & 7を検出した。正常に見える回腸末端部に由来する4つの粘膜生検サンプルを、分析のために得 (コントロール N = 3, IBD N = 3)、2つの生検サンプルを、液体窒素の中に入れ、サイトカインアッセイに使用するまで - 80 で貯蔵した。2つの生検サンプルを、OCT (Tissue-Tek, Torrance, CA) の中に包埋し、液体窒素の中に入れ、切片を調製するまで - 80 で貯蔵した。

【0045】

試薬

ニゲリシン (Invitrogen, Burlington, ON)、Ac-YVAD-CMK (Alexis Biochemicals, Farmingdale, NY)、種々の直径 (0.5 ~ 6μm) のFluoresbriteTM Yellow Green Carboxylate Microspheres (Polysciences Inc, Warrington, PA) を購入した。IV型ビリ線毛を、Pseudomonas aeruginosa K株から以前に記載された方法で調製し、SDS-PAGEによる純度、アシアロ-GM1に結合するがGM1には結合しない能力、およびステンレス鋼に結合する能力に関して特徴付けした。上記ビリ線毛調製物は、銀染色したSDS-PAGEゲル上で検出可能でなかった少量のP. aeruginosa血清型05 LPSを含んだ。Escherichia coli TMW2.497は、Dr. M. Gantzleの厚意であったプラスミドpQBI-63上に緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする遺伝子を有するE. coli JM109誘導体であった。

【0046】

細胞培養およびインビトロ透過性の測定

T84ヒト結腸がん上皮細胞を、ダルベッコ最小必須培地 (DMEM) / F-12、10% (v/v) 熱非働化ウシ胎仔血清 (FBS)、1% (w/v) ペニシリン - ス

トレプトマイシン中で、組織培養プレート(10 cm)で維持した。その細胞をTranswells(2×10⁵ 細胞/ウェル、6.5 mm直径; 0.4 μm孔サイズ; Corning Life Sciences, Tewksbury, MA)にプレートし、研究のために頂端細胞接着複合体(apical junctional complex)(経上皮抵抗>2,000 Ω・cm²によって示される場合)の発生まで増殖させた。カスパーゼ-1阻害実験に関しては、ニゲリシン処理前に、組織培養培地を除去し、50 μM カスパーゼ-1インヒビター(Ac-YVAD-CMK)を含む新たな培地を導入した。ニゲリシン(10、25、50 μM)を、Transwellの頂端側および基底側の両方に添加した。経上皮抵抗(TER)を、Millicell-ERS Voltmeterおよび簞型電極(Millipore, Bedford, MA)を使用して、ニゲリシン処理の前および処理3時間後に測定した。ミクروسフェアおよびE.coli実験のために、ニゲリシンとともに一晩インキュベートした後、10⁷/mlの1 μm ミクロスフェアもしくは10⁹/ml E.coli TMW2.497を、Transwellの頂端側に添加した。ミクロスフェアもしくはE.coliとともにインキュベートして1時間後、細胞を冷メタノール中で5分間固定した。次いで、細胞を0.2%(v/v) Triton X-100で15分間透過性にし、0.2%(v/v) ヤギ血清および1%(w/v) BSAを含むPBS中で1時間ブロックした。

10

【0047】

タンパク質抽出

20

ヒト生検サンプルおよび齧歯類回腸組織を、溶解緩衝液(0.01 M PBS、0.5%(v/v) Tween 20、およびHaltプロテアーゼインヒビター(ジメチルスルホキシドおよび4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホニルフルオリド(Thermo Scientific, Pittsburgh, PA)を含む))中、氷の上でタンパク質抽出のためにホモジナイズした。タンパク質含有上清を、13,000 gで30分間、4℃での遠心分離によって分離し、分析まで-70℃で貯蔵した。

【0048】

サイトカイン発現アッセイ

ヒトサンプル由来の活性IL-1βの濃度を、Human IL-1β Ultra-Sensitive Kit(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)で測定した。マウス腸組織における活性IL-1β発現を、Mouse ProInflammatory 7-Plex Ultra-Sensitive Kit(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)で測定した。得られたサイトカインを、ピシンコニン酸アッセイ(Pierce, Rockford, IL)によって決定される場合の各個々のサンプルの総タンパク質含有量に対して正規化した。

30

【0049】

ウェスタンブロット分析

ヒト生検組織、マウス回腸粘膜をこすり取ったものおよびT84細胞を、プロテアーゼインヒビターを含むM-PER Mammalian Protein Extract ion Reagent(Thermo Scientific, Pittsburgh, PA)中に溶解した。総細胞溶解物(サンプルに対して正規化した50 μg タンパク質)を、15% SDS-PAGEゲルに載せ、その後、ニトロセルロース膜へのタンパク質の電気泳動転写を行った。膜をODYSSEYブロッキング緩衝液(Infrared Imaging System, Marysville, OH)で1時間、室温(RT)においてブロックし、ローディングコントロールとして働くβ-アクチン抗体(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)とともに、4℃において一晩、IL-1β抗体(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)もしくはカスパーゼ-1抗体(Abcam, Cambridge, MA)でプローブした。洗浄後、膜を蛍光二次抗体とともに

40

50

に1時間RTにおいてインキュベートし、LI-COR Odyssey* (Infrared Imaging System, Marysville, OH)によって分析した。

【0050】

細胞培養物および腸サンプルの免疫蛍光分析

カスパーゼ-1活性化および透過性実験からの細胞培養サンプルを、冷メタノール中で5分間固定し、ウサギ抗ZO-1一次抗体 (Invitrogen, Burlington, ON)とともに一晩、4においてインキュベートした。洗浄後、細胞を、カスパーゼ-1活性化に関するFLICA-1染料もしくはヤギ抗ウサギIgG Alexa546抗体 (Invitrogen, Burlington, ON)いずれかの1:150希釈物とともにインキュベートし、DAPIで対比染色した。次いで、単層を支持している膜を切り出し、スライドガラス (DakoCytomation Mounting Medium, Carpinteria, CA)に載せた。凍結ヒト生検サンプルを、5μmの切片にし、風乾し、アセトン固定し、その後、活性化カスパーゼ1に関してはFLICA-1の1:50希釈物で、および活性化カスパーゼ-3&7に関してはFLICA 3&7 (Immunochemistry Technologies LLC, Bloomington, MN)の1:50希釈物で染色した。次いで、切片を4%パラホルムアルデヒドで15分間、RTにおいて後固定し、F-アクチンに関してはローダミン-ファロイジン (Invitrogen, Burlington, ON)で、および核に関してはDAPIで染色した。

【0051】

齧歯類腸凍結組織ブロックを、クリオスタットを使用して5μmの切片にし、RTにおいて30分間静置し、PBS中にあらたに調製した4%パラホルムアルデヒドの中で30分間固定した。そのスライドをPBSで10分洗浄し、PBS中の2%ヤギ血清および1%BSAで1時間RTにおいてブロックし、PBS中2%ヤギ血清および1%BSAの中の0.2%Triton-X100で30分間透過性にした。スライドを、PBS中1:40希釈したAlexa568結合ファロイジンとともに1時間インキュベートすることによって染色し、過剰な蛍光色素を50ml PBSでの3×15分のすすぎによって除去し、DAPIで対比染色した。そのスライドを、封入剤としてFluor Save試薬 (Calbiochem)を使用して検鏡用に固定した。

【0052】

増殖性細胞核抗原 (PCNA) 染色

マウス回腸末端部組織を、以前に公開された方法を使用して、ウサギ抗PCNA抗体 (Abcam, Cambridge, MA)で染色した。PCNAに関する染色後に、その切片をDAPIで染色し、Zeiss倒立顕微鏡法 (Zeiss, Toronto, Ontario)で画像化した。PCNA陽性細胞を、最低限でも動物1匹あたり5つのピリ絨毛において2名の盲検状態の評価者に計数させた。

【0053】

インビボ透過性アッセイ

インビボ透過性を、FITC-デキストランの透過、蛍光ミクロスフェアおよび細菌移動研究で評価した。デキストラン研究のために、自由に水を利用させて一晩絶食させた後、マウスに0.6μg/kg FITC-デキストラン (FD-4, 4kD; Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を強制投与した。心臓穿刺後4時間で血液サンプルを集め、血清を1,957×gで4において20分間遠心分離にかけた。上清の蛍光発光を、Typhoon Variable Mode Imager (GE Healthcare, Piscataway, NJ)で488nmレーザーを使用して測定した。

【0054】

ミクロスフェア研究のために、マウスに、200μl 溶液中に0.5μm、1.0μm、2.0μm、3.0μm、および6.0μmの直径を有する10⁷ Fluores

b r i t e (登録商標) Y G ミクロスフェアを含む混合物を、一晚の絶食後に以前に記載されるように強制投与した。上記ビーズの投与後 4 時間で血液サンプルを集めた。次いで、予めヘパリン処理したチューブの中で全血混合物を $1,250 \times g$ で 10 分間、RT において遠心分離にかけ、そのサンプルの血漿部分を取り出し、フローサイトメトリー分析の前に、 $1,250 \times g$ で 5 分間遠心分離にかけた。上記サンプルの残ったバフィーコートおよびヘマトクリットを、5 mL の溶解緩衝液 ($4.15 g \text{ NH}_4\text{Cl}$ 、 $0.84 g \text{ NaHCO}_3$ 、 $1 \text{ mL } 0.5 \text{ mM EDTA (pH 8)}$)、および 500 mL の ddH_2O) で RT において溶解し、混合し、 $1,250 \times g$ で 5 分間、4 において 3 回遠心分離にかけた。上清を廃棄した。WBC ペレットを、ウシ胎仔アルブミンを含む $0.03\% \text{ PBS}$ の $400 \mu\text{l}$ 中で、再懸濁した。血漿サンプルおよび WBC ペレットサンプルを、ミクロスフェア数を決定するためにフローサイトメトリーで分析した。

10

【0055】

細菌移動研究のために、マウスに、 0.17 mL の LB ブロス中に懸濁した $1 \times 10^{10} \text{ CFU}$ の GFP 標識 *E. coli* を強制投与した。20 時間後、脾臓および肝臓のサンプルを、無菌手術条件下で集めた。器官を、予め秤量した LB ブロス入りチューブ中で懸濁し、無菌 RNAase 非含有プラスチック乳棒で 5 ~ 10 分間ホモジナイズした。そのホモジネートを遠心分離にかけ、その上清を種々の希釈度で培養のために 4 枚のプレートにプレートした。

【0056】

共焦点レーザー内視鏡検査および共焦点顕微鏡検査

20

マウス回腸の共焦点レーザー内視鏡検査および上皮ギャップ密度の決定のためのホールマウントマウス腸組織の共焦点顕微鏡検査を、以前に記載された方法を使用して行った。細胞培養、ヒトおよびマウスの腸スライドを、スピニングディスク型共焦点顕微鏡 (Quorum Technologies Inc, Guelph, ON) を使用して、以前に記載された方法を使用して画像化した。

【0057】

電子顕微鏡検査

コントロールおよびニゲリシン処理した T84 細胞を、 0.1 M カコジル酸 - HCl ($\text{pH } 7.4$) で一晚 4 において緩衝化した $2\% (\text{v/v})$ グルタルアルデヒドを用いて固定化した。固定の後、それらをカコジル酸緩衝液中で洗浄し、 $1\% (\text{w/v})$ 四酸化オスミウム中で 2 時間後固定し、次いで、カコジル酸緩衝液で再洗浄した。段階的な一連のエタノール濃度で脱水した後、標本をプロピレンオキシドのいくつかの洗浄液に入れ、その後、エポキシ樹脂 (EPON 12) に包埋した。超薄切片を、酢酸ウラシルおよびクエン酸鉛でコントラストを上げ、加速電圧 60 kV で Hitashi 7650 透過型電子顕微鏡で検鏡した。視野を記録し、 $1000 \sim 4800$ の最終倍率でプリントし、カーボン格子レプリカの助けを借りて校正した。

30

【0058】

統計分析

GraphPad (La Jolla, CA) Prism 4 によって計算した Wilcoxon ランクサム検定を使用して、サンプルを比較した。 0.05 未満の両側 P 値を、有意とみなした。多重比較のために Bonferroni 調整を行った。

40

【0059】

C2. 実験: IEC ギャップ法

方法

これは、ClinicalTrial.gov (NCT00988273) で登録された前向きコホート研究であった。研究プロトコルは、University of Alberta の Human Ethics Research Review Board によって検討および承認された。研究群は、Rome III 基準に基づいて、IBS と一致する症状を有する患者からなった。コントロール群は、他の適応症について結腸内視鏡検査を受けており、IBS の症状、最も一般的には、結腸直腸がんスクリーニングお

50

よび便潜血検査陽性を有しない患者からなった。研究の包含基準は、以下であった：18歳齢より上で書面によるインフォームドコンセントを与える能力がある患者。排除基準は、以下を含んだ：フルオレセインもしくは貝類に対するアレルギーのあることが既知、腎臓機能が損なわれている（血清クレアチニンが 1.5 mg/dL を超える）、および妊娠もしくは授乳している患者。全ての患者は、研究参加への書面によるインフォームドコンセントを与えた。患者の人口統計学、病歴、身体検査所見、および内視鏡検査所見を、前向きデータベースに記録した。

【0060】

本発明者らは、全ての患者において、回腸末端部の挿管によって標準結腸内視鏡検査を行った。患者に標準心肺機能モニタリングを行い、ミダゾラムおよびフェンタニルでの静脈内鎮静を与えた。蠕動および移動人工産物（movement artifacts）を低減するために必要な場合、鎮痙剤（グルカゴン）を使用した。回腸末端部の挿管後に、 5 mL の10%フルオレセイン溶液を静脈内投与した。回腸末端部の共焦点画像を、以前に報告されたプロトコルに従って、超高分解能（ultra-high-definition）プロープベースの共焦点レーザー内視鏡検査（pCLE）プロープ（UHD Coloflex, Mauna Kea Technologies, Paris, France）で得た。回盲弁に対して近位約 10 cm にある回腸末端部のコマ毎の共焦点画像を集め、分析のためにデジタル保存した。回腸末端部において最低5つの異なる部位を、pCLEを使用して画像化した。pCLE画像化は通常、回盲弁から 10 cm 近位側で始められ、その後、画像化の開始部位に対して $5\sim 10\text{ cm}$ の間で近位にある腸表面から、5から10部位のサンプリングを行った。pCLEビデオ画像の連続記録を、全ての患者で約10分間行い、患者1名あたり4000枚超の画像を記録した。pCLEを行う内視鏡検査医は、患者の状態について盲検状態でなかったが、pCLE画像の評価者は、患者の状態および結腸内視鏡検査の適応症について盲検状態であり、バイアスを最小限にした。

【0061】

pCLE画像の検討および分析を、以前に記載されたように事後様式で行った。適切に画像化された絨毛は、pCLE画像で可視化された75%表面積を覆う絨毛として定義され、最低でも、見られる絨毛の3連続視野を、上皮細胞およびギャップの分析に選択した。これら絨毛画像のうち、任意の個々の患者で見られる（範囲：患者1名あたり3～10の絨毛）ギャップの最高頻度を有した絨毛における上皮細胞およびギャップを計数した。計数した絨毛の代表画像を図1に示す。上皮細胞およびギャップを、絨毛で手動で計数し、任意の個々の患者に関する上皮ギャップの最高頻度を使用して、ギャップ密度を決定した（範囲：患者1名あたり3～10の絨毛を評価）。ギャップ密度を、適切に画像化した絨毛で計数した上皮細胞1000個あたりの上皮ギャップの数として計算した。

【0062】

初期研究エンドポイントは、IBS患者およびコントロール患者においてpCLEによって決定される場合の上皮ギャップ密度のコホート比較であった。本発明者らはまた、上皮ギャップ密度と、性別、年齢およびIBSのサブタイプ（IBS-下痢型 対 IBS-便秘型）との間の関連性を調べるために探索分析を行った。

【0063】

統計分析

サンプルサイズ計算：

サンプルサイズ計算を、本発明者らの以前の研究^{2,4}からの無症候性患者およびIBS患者の上皮ギャップ密度データに基づいて行った。 10 ギャップ/ 1000 細胞という平均ギャップ密度の差異および 10 ギャップ/ 1000 細胞という標準偏差を想定すると、合計32名の患者（1群あたり16名）が、タイプI誤差（ α ）0.05で80%検出力を達成するために必要とされる。ノンパラメトリック法が使用されると予測されたので、患者登録を、合計35名の患者に対して約10%増やした。

【0064】

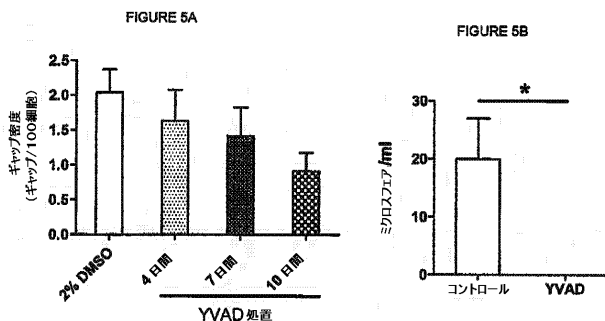
研究の初期エンドポイントは、上皮ギャップ密度であり、コントロール患者とIBS患者との間の比較は、Wilcoxonランクサム検定を使用して行った。正規分布した連続変数を、平均±標準偏差として表した一方で、正規分布しなかった連続変数を、メジアン（四分位数範囲）として表した。Shapiro-Wilk検定を使用して、上皮ギャップ密度の分布の正規性を評価した。さらなる分析に、ノンパラメトリック法（Wilcoxonランクサム検定、Spearman相関、およびメジアン回帰を含む）を使用した。初期分析のために、0.05未満の両側P値を有意とみなした。全ての分析を、STATAデータ分析および統計ソフトウェア（StataCorp LP, College Station, Texas）を使用して行った。

【0065】

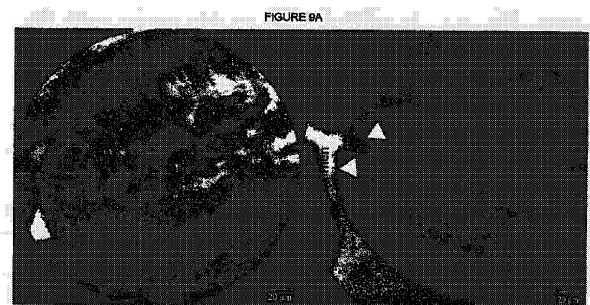
本発明は、具体的な局面、実施形態、および適用に関して記載されてきたが、特許請求されるとおりの本発明から逸脱することなく、種々の変更および改変がなされ得ることは、認識される。

10

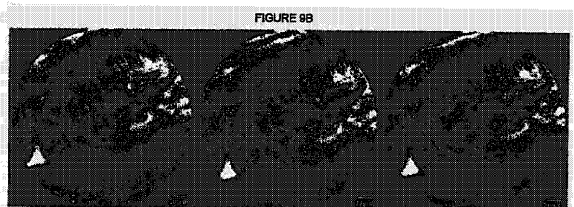
【図5】



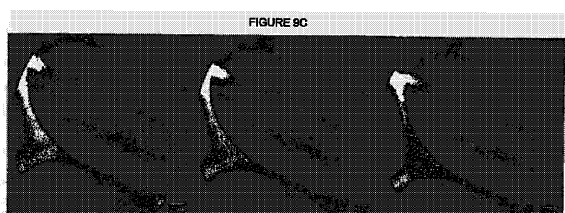
【図9A】



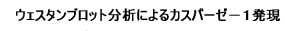
【図9B】



【図9C】



【 図 1 1 】

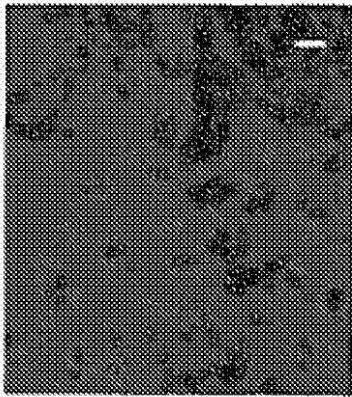


Group	Relative Response Rate (相対的薬価測定)
コントロール	~0.28
クローン病	~0.50

*=P<0.05

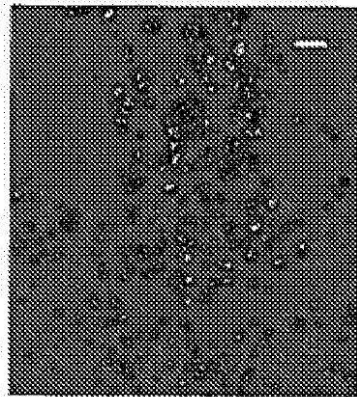
【 図 1 】

FIGURE 1A-1



コントロール

FIGURE 1A-2



ニゲリシン 50μM

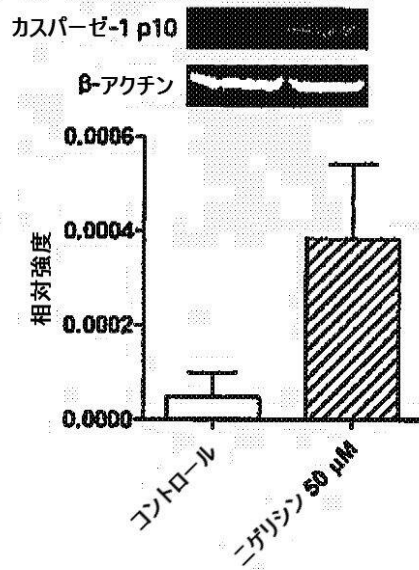
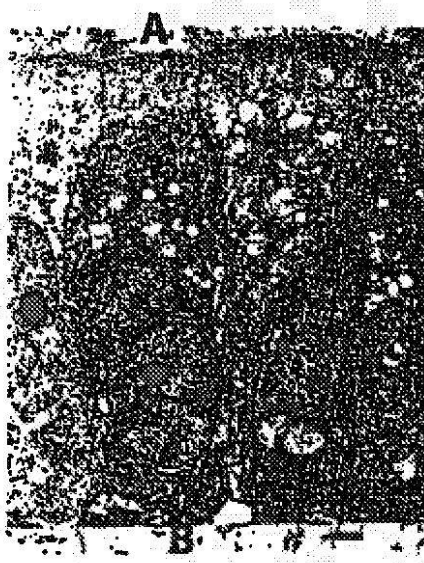
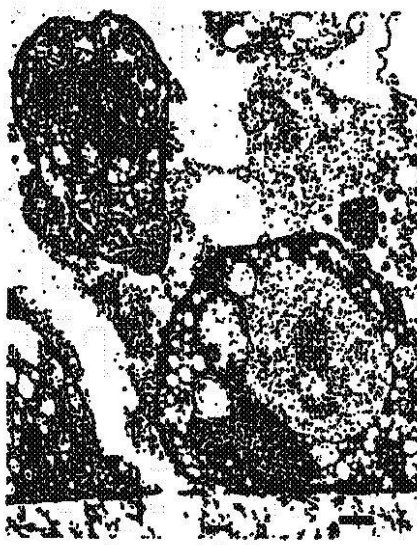


FIGURE 1B



コントロール

FIGURE 1C-1



ニゲリシン 50μM

FIGURE 1C-2

【 図 2 】

FIGURE 2A

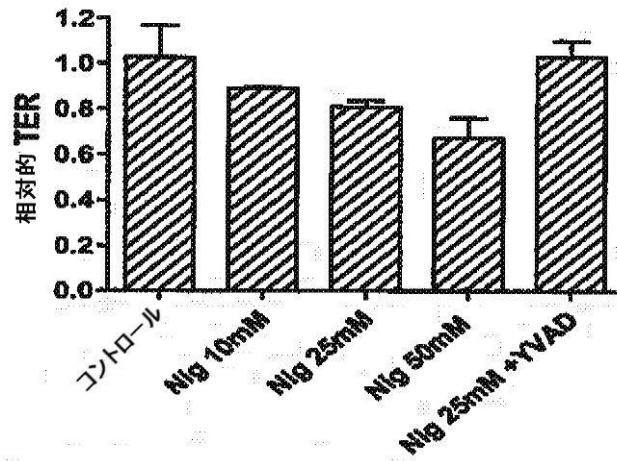
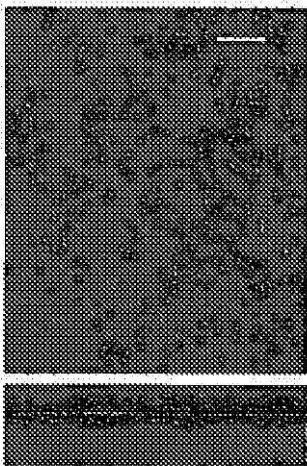
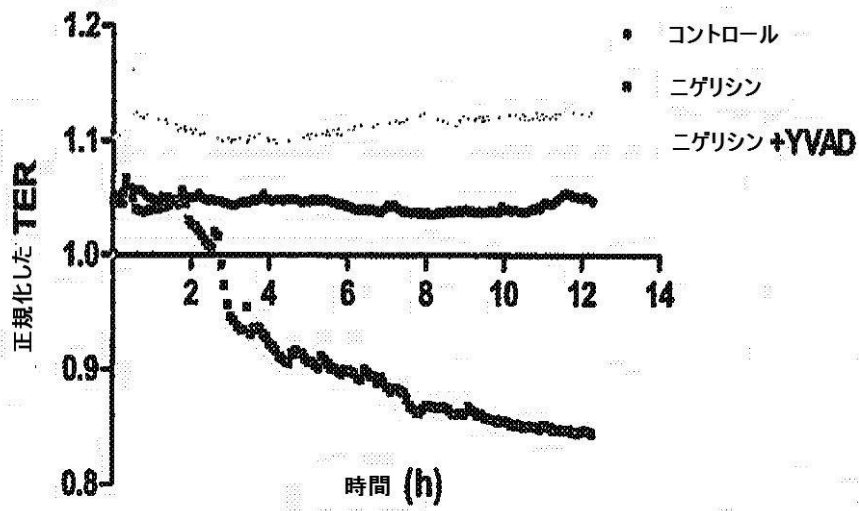


FIGURE 2B



コントロール

FIGURE 2C-1

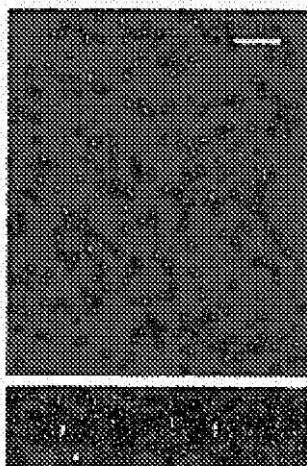
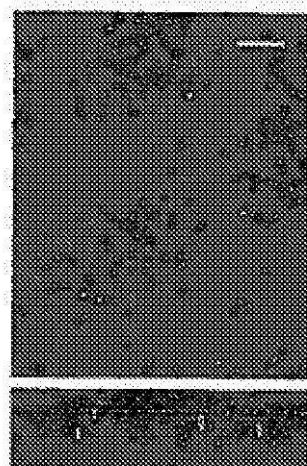
ニゲリシン + *E.coli*

FIGURE 2C-2



ニゲリシン + ミクロスフェア

FIGURE 2C-3

【 図 3 】

FIGURE 3A

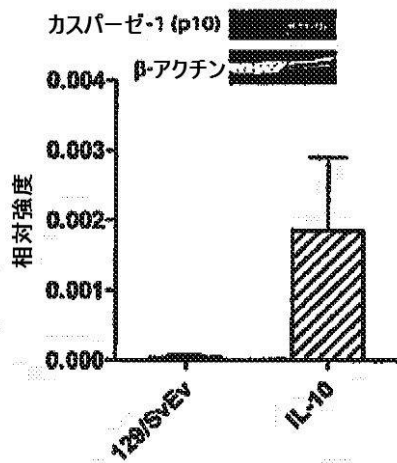


FIGURE 3B

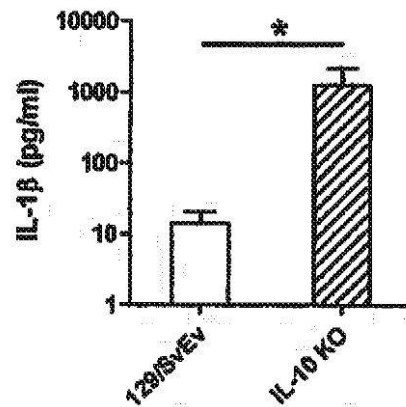


FIGURE 3C-1

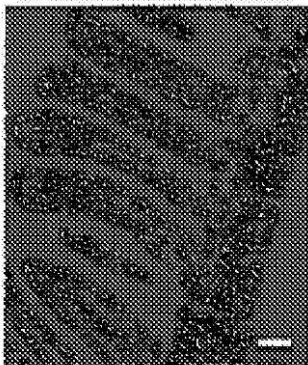
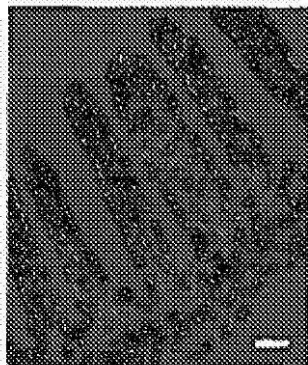
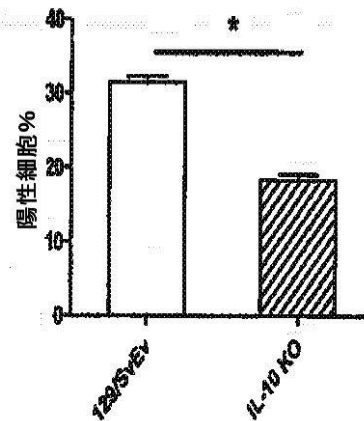


FIGURE 3C-2



IL-10 KO

FIGURE 3D



【 図 4 】

FIGURE 4A

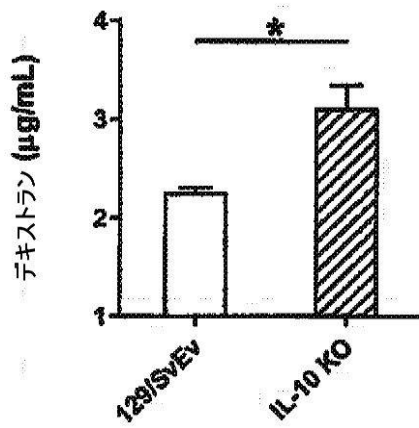


FIGURE 4B

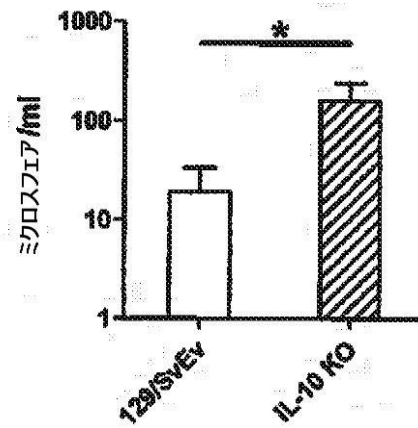


FIGURE 4C

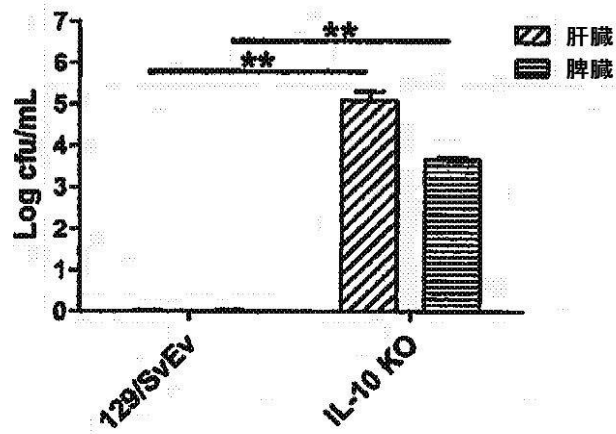
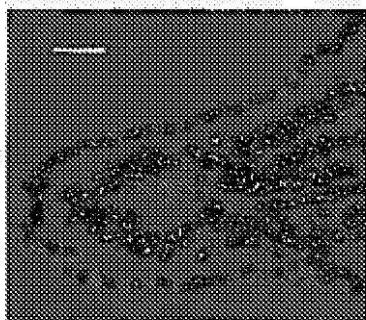
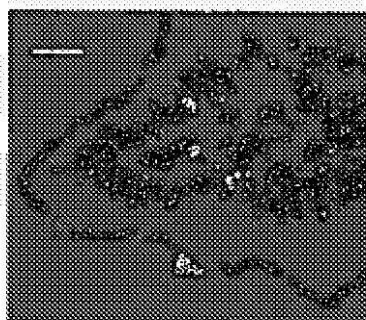


FIGURE 4D-1



129/SvEv

FIGURE 4D-2



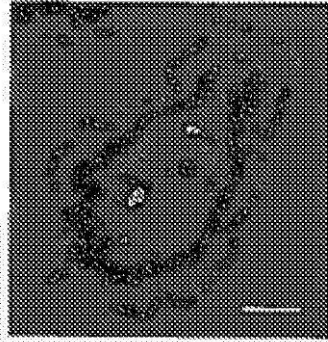
IL-10 KO

【 図 6 】

FIGURE 6A-1

CON

FLICA 1



FLICA 3/7

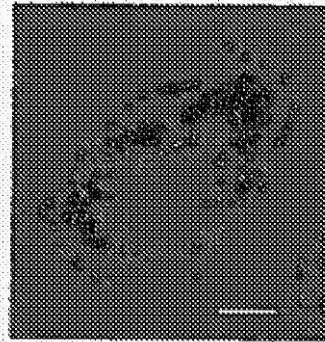


FIGURE 6A-2

FIGURE 6A-3

IBD

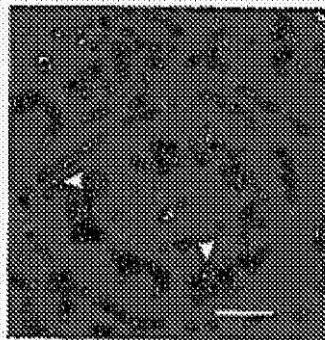
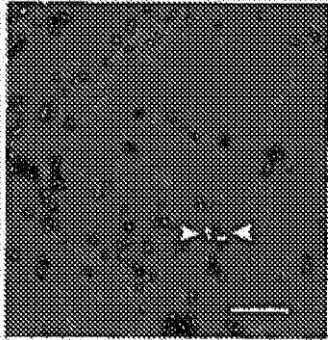
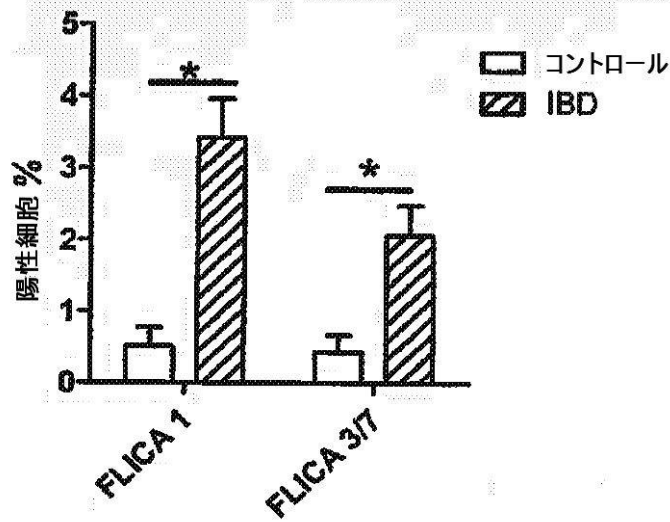


FIGURE 6A-4

FIGURE 6B



管腔吸引物1mLあたりの
押し出された細胞

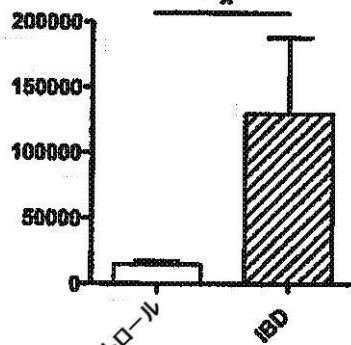


FIGURE 6C

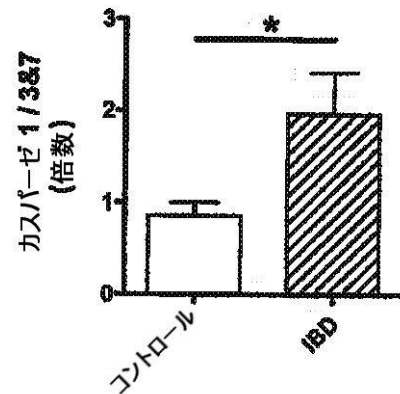


FIGURE 6D

【 図 7 】

FIGURE 7A

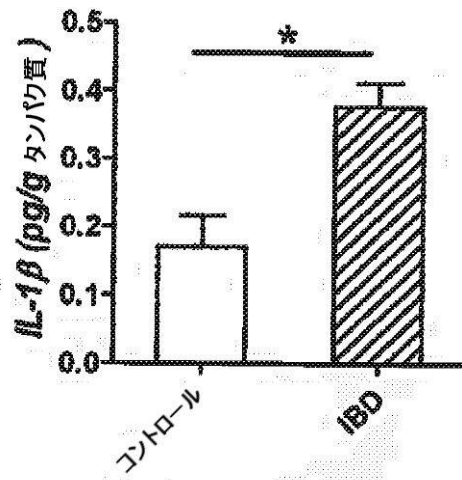


FIGURE 7B

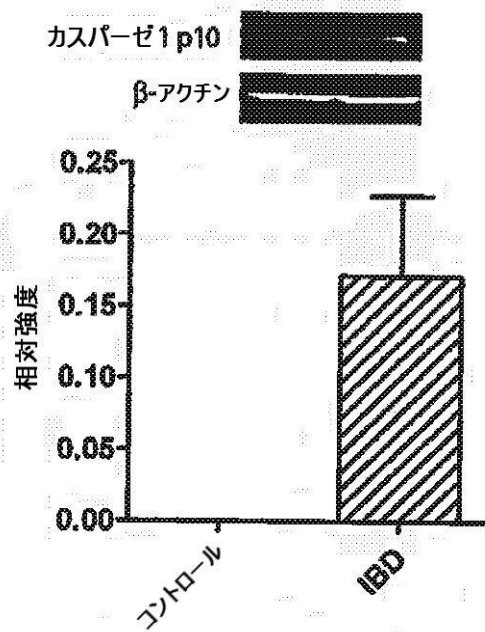
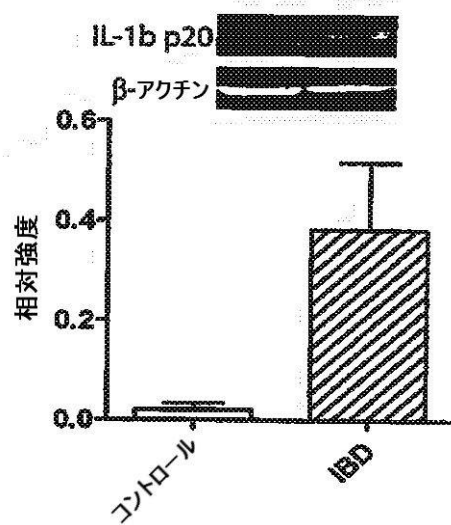


FIGURE 7C



【 図 8 】

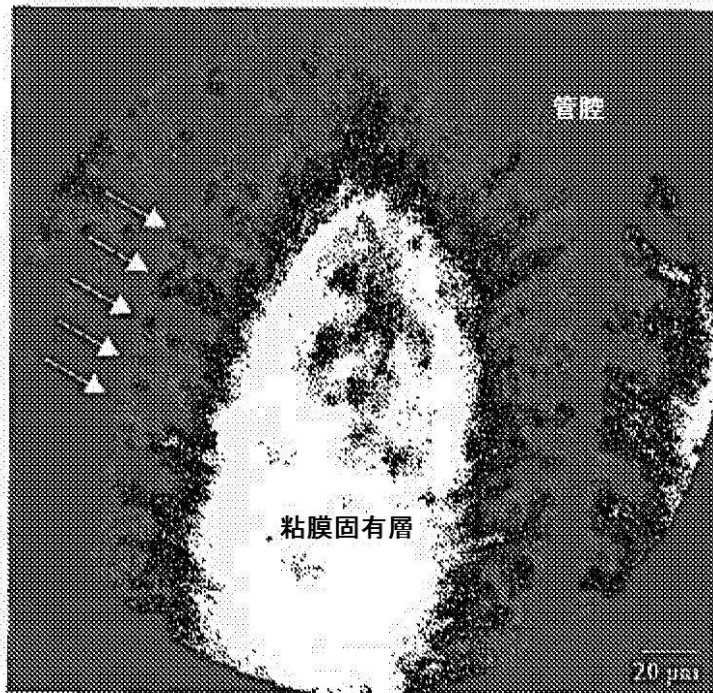


FIGURE 8

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成27年5月8日 (2015.5.8)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2015528573000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/058296
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/37 (2013.01) USPC - 506/41 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12Q 1/37; G01N 33/573, 33/574 (2013.01) USPC - 435/7.23; 506/10, 41 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - G01N 33/5008, 33/6893, 2800/065 (2013.01) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	KNODLER et al. "Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia," Proceedings of the National Academy of Sciences, 12 October 2012 (12.10.2012), Vol. 107, No. 41, Pgs. 17733-17738. entire document	1, 5, 9, 11-14, 19, 20, 23 2-4, 6-8, 15, 22, 24
X	LIU et al. "Mind the Gaps: Confocal Endomicroscopy Showed Increased Density of Small Bowel Epithelial Gaps in Inflammatory Bowel Disease," Journal of Clinical Gastroenterology, 01 March 2011 (01.03.2011), Vol. 45, Pgs. 240-245. entire document	16-18
Y	WO 2011/128429 A1 (DARFEUILLE-MICHAUD et al) 20 October 2011 (20.10.2011) entire document	2, 4
Y	US 2003/0040681 A1 (NG et al) 27 February 2003 (27.02.2003) entire document	3, 24
Y	US 2010/0003196 A1 (GRAY) 07 January 2010 (07.01.2010) entire document	6-8
Y	US 2010/0222228 A1 (THIELEMANS et al) 02 September 2010 (02.10.2010) entire document	15
Y	US 2005/0136492 A1 (PHELPS et al) 23 June 2005 (23.06.2005) entire document	22
P, X	LIU et al. "Epithelial Cell Extrusion Leads to Breaches in the Intestinal Epithelium," Inflammatory Bowel Diseases, 18 March 2013 (18.03.2013), Vol. 19, Pgs. 912-921. entire document	1-24
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 December 2013		Date of mailing of the international search report 10 JAN 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
A 6 1 B	1/00	(2006.01)	A 6 1 B	1/00	3 0 0 D		
C 1 2 Q	1/00	(2006.01)	C 1 2 Q	1/00	Z		
C 0 7 K	5/107	(2006.01)	C 0 7 K	5/107	Z N A		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(72) 発明者 リウ, ジュリア
アメリカ合衆国 アーカンソー 7 2 2 2 3, リトル ロック, ミラマー ブールバード 4
1 2

(72) 発明者 アービン, ランダル トーマス
カナダ国 ティー 8 エイチ 1 イー 2 アルバータ, シェアウッド パーク, チェルシー マ
ナー 9

(72) 発明者 デイビス, エリザベス メリカ
カナダ国 ティー 6 ジェイ 4 ゼット 3 アルバート, エドモントン, サドルバック ロード
6 0 4

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA20 FB12 GC15
2G052 AA33 AB21 AD14 AD34 AD54 FA09 GA32
4B063 QA01 QQ36 QR48 QR56 QS32 QX02
4C161 AA04 BB01 CC00 DD03 HH51
4H045 AA30 BA13 BA70 DA56 EA50 FA40

专利名称(译)	用于检测肠细胞屏障功能障碍的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2015528573A	公开(公告)日	2015-09-28
申请号	JP2015530160	申请日	2013-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	Riujuria		
申请(专利权)人(译)	刘，朱莉娅		
[标]发明人	リウジュリア アービンランダルトーマス デビスエリザベスメリカ		
发明人	リウ, ジュリア アービン, ランダル トーマス デビス, エリザベス メリカ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/483 G01N33/543 G01N1/30 A61B1/00 C12Q1/00 C07K5/107		
CPC分类号	A61P1/04 A61P29/00 C07K14/8128 G01N33/573 G01N2333/96413 G01N2800/065 A61B5/0068 A61B5/0084 A61K49/0041 A61K49/0056 G01N2333/96469		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N33/483.C G01N33/543.575 G01N1/30 A61B1/00.300.D C12Q1/00.Z C07K5/107.ZNA		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA20 2G045/FB12 2G045/GC15 2G052/AA33 2G052/AB21 2G052 /AD14 2G052/AD34 2G052/AD54 2G052/FA09 2G052/GA32 4B063/QA01 4B063/QQ36 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS32 4B063/QX02 4C161/AA04 4C161/BB01 4C161/CC00 4C161/DD03 4C161 /HH51 4H045/AA30 4H045/BA13 4H045/BA70 4H045/DA56 4H045/EA50 4H045/FA40		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/697190 2012-09-05 US		
其他公开文献	JP2015528573A5 JP6203846B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 公开了一种用于检测患者的肠细胞屏障功能障碍的方法。在一种方法中，患者的肠上皮细胞（IEC），口咽上皮细胞（OEC）或口腔上皮细胞（BEC）用对caspase-1和caspase-3 & 7特异的可检测探针染色，检查细胞中是否存在升高的胱天蛋白酶-1水平，如通过显著更高的胱天蛋白酶-1标记物与胱天蛋白酶-3和7的比例作为细胞屏障功能障碍的指标所证明的。在第二种方法中，通过基于探针的共聚焦激光内窥镜检查（pCLE）获得患者的IEC，OEC或BEC的原位图像，并分析图像的细胞间隙密度。还公开了用于检测肠细胞屏障功能障碍的探针组合物。	(21) 出願番号 特願2015-530160 (P2015-530160) (86) (22) 出願日 平成25年9月5日 (2013. 9. 5) (85) 翻訳文提出日 平成27年4月9日 (2015. 4. 3) (86) 国際出願番号 PCT/US2013/058296 (87) 国際公開番号 WO2014/039699 (87) 国際公開日 平成26年3月13日 (2014. 3. 13) (31) 優先権主張番号 61/697, 190 (32) 優先日 平成24年9月5日 (2012. 9. 5) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 515057908 リウ, ジュリア アメリカ合衆国 アーカンソー 72223, リトル ロック, ミラマー プールバード 412 (74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策 (74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹 (74) 代理人 100181674 弁理士 飯田 貴敏 (74) 代理人 100181641 弁理士 石川 大輔 (74) 代理人 230113332 弁理士 山本 健策
--	--	---