

(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2010-540948

(P2010-540948A)

(43) 公表日 平成22年12月24日(2010.12.24)

(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 P	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

(21) 出願番号 特願2010-527431 (P2010-527431)
 (86) (22) 出願日 平成20年9月30日 (2008. 9. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年5月28日 (2010. 5. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/063081
 (87) 国際公開番号 W02009/043848
 (87) 国際公開日 平成21年4月9日 (2009. 4. 9)
 (31) 優先権主張番号 UD2007A000183
 (32) 優先日 平成19年10月1日 (2007. 10. 1)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

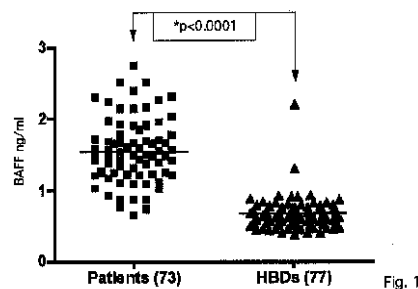
(71) 出願人 510089502
 ユニヴェルシタ デグリ ストゥディ デ
 イ ウーディネ
 UNIVERSITA' DEGLI S
 TUDI DI UDINE
 イタリア, イー33100 ウーディネ,
 ヴィア パッラーディオ, 8
 Via Palladio, 8, I-33
 100 Udine, Italy
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人原謙三国際特許事務所
 (72) 発明者 クルチオ, フランチェスコ
 イタリア, イー33010 パニャッコ,
 ヴィア デル コルモー, 7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫に関連した輸血反応のための予測試験およびモニタリング試験としての、サイトカインBリンパ球刺激因子 (B L Y S) の血清学的なアッセイの使用

(57) 【要約】

患者における、臓器に特異的な自己免疫性疾患（例えばセリアック病および自己免疫性甲状腺炎）および/または輸血反応および/またはI g A 欠乏症を包含する、免疫介在性疾患の過程における、診断、予測、および治療有効性のスクリーニングのための、血清サイトカインBリンパ球刺激因子 (B L y S) のアッセイの使用は、以下のステップを包含する。すなわち、患者から血液サンプルを採取する最初のステップと、この血液サンプルを分析して、サイトカインB L y Sの濃度を決定するステップと、先のステップにおいて決定されたB L y Sのレベルと、サイトカインB L y Sの濃度の1つ以上の参照値とを比較するステップと、先のステップにおいて示唆された、サイトカインB L y Sの決定された濃度とサイトカインB L y Sの濃度の参照値との間の、有意な偏差を特定するステップと、先のステップに基づいて、上述の免疫介在性疾患に対して、診断を行うおよび/または予測を行う、および/または治療有効性を判断するステップとを包含する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者において免疫介在性疾患を確定するための診断用マーカーとしてのサイトカイン B リンパ球刺激因子 (B L y S) のアッセイの使用であって、

該免疫介在性疾患は、

セリアック病、および自己免疫性甲状腺炎などの、臓器に特異的な自己免疫性疾患と

、
輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、および輸血反応などの、輸血に関連した免疫介在性疾患と、

を含む群に包含され、

10

該患者は、該免疫介在性疾患を示唆する症状または徴候を有する、および / または該免疫介在性疾患が疑われる状況にある、および / または該免疫介在性疾患の素因を有する患者であり、

該患者から血液サンプルを採取する第 1 のステップと、

該血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第 2 のステップと

、
第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度を、健康なコントロール群について前もって得られたサイトカイン B l y S の濃度の 1 つ以上の参照値と比較する第 3 のステップと、

20

第 3 のステップにおける比較から導き出される、第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B l y S の濃度と該健康なコントロール群について前もって得られたサイトカイン B l y S の濃度の参照値との間の、有意な偏差を特定して、該免疫介在性疾患の一つに罹患したとして患者を選択する第 4 のステップと、

該免疫介在性疾患の一つに罹患したとして選択された患者の、第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、サイトカイン B l y S の濃度の 1 つ以上の参照値であって、該免疫介在性疾患に罹患した、および / または活動性疾患またはその特定の過程の診断が確立された、一連の患者について前もって得られた B L y S の参照値の範囲内である参照値とを比較する第 5 のステップと、

第 5 のステップにおいてなされた比較に基づいて、該免疫介在性疾患の 1 つ以上の確定的な疾患の診断を行う第 6 のステップと、

30

を包含する方法における、使用。

【請求項 2】

前記方法の前記第 2 のステップが、E L I S A の技術に基づく自動装置を用いて実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

免疫介在性疾患の過程におけるクローン性の B 細胞または T 細胞の出現において、患者を経時的にモニタリングするための方法におけるマーカーとしてのサイトカイン B L y S のアッセイの使用であって、

該免疫介在性疾患は、

セリアック病、および自己免疫性甲状腺炎などの、臓器に特異的な自己免疫性疾患と

40

、
輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、および輸血反応などの、輸血に関連した免疫介在性疾患と、

I g A 欠乏症、および分類不能型免疫不全症などの、免疫不全症と、

の群に包含され、

該方法は、

該免疫介在性疾患に罹患した患者から血液サンプルを採取する第 1 のステップと、

該血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第 2 のステップと

、
第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、サイトカイン B L

50

y S の濃度の 1 つ以上の参照値および / または患者から前もって検出されたサイトカイン B L y S の 1 つ以上の値とを比較する第 3 のステップと、

第 3 のステップにおける比較から導き出される、第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と第 3 のステップにおいて示されたサイトカイン B L y S の濃度の参照値との間の、有意な偏差を特定する第 4 のステップと、

第 4 のステップにおいて特定された偏差に従って、該免疫介在性疾患の過程において B 細胞のクローン性 / T 細胞のクローン性へと進行するリスクが発生するとみなす第 5 のステップと、

第 5 のステップの結果に基づいて、第 1 のステップから第 5 のステップを所定の時間間隔で経時的に繰り返すことを決定する第 6 のステップと、

を包含する、使用。

【請求項 4】

免疫介在性疾患の予測をするための方法における予測用マーカーとしてのサイトカイン B リンパ球刺激因子 (B l y S) の使用であって、

該免疫介在性疾患は、

セリアック病、および自己免疫性甲状腺炎などの、臓器に特異的な自己免疫性疾患と

、
輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、および輸血反応などの、輸血に起因する免疫介在性疾患と、

を含む群に包含され、

該方法は、

i) 慢性の細菌感染症 (肝炎ウイルス、疱疹ウイルス、クラミジアなど) の存在、

i i) 疾患の発病のプロセスまたは一般に使用される治療法の対象における、特定の H L A の遺伝子型または重要因子をコードする遺伝子の存在、

i i i) 甲状腺腫を伴う、または伴わない無症候性甲状腺機能低下症、

i v) 産後の鬱病および / または産後の甲状腺機能低下症、

v) 1 つ以上の活動性の免疫介在性疾患の存在、

v i) 輸血の必要性、および

v i i) 新しい治療法の開始

の状況の 1 つ以上によって特徴付けられる患者を選択する予備的なステップと、

選択された患者から血液サンプルを採取する第 1 のステップと、

該血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第 2 のステップと

、
第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、サイトカイン B L y S の濃度の 1 つ以上の参照値とを比較する第 3 のステップと、

第 3 のステップにおける比較から導き出される、第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と第 3 のステップにおいて考慮される参照値との間の、有意な偏差を特定する第 4 のステップと、

該免疫介在性疾患について第 4 のステップにおいて特定された偏差に基づいて、予測を行う第 5 のステップと、

を包含する、使用。

【請求項 5】

免疫介在性疾患に罹患した患者の治療をモニタリングする方法におけるマーカーとしてのサイトカイン B L y S のアッセイの使用であって、

該免疫介在性疾患は、

セリアック病、および自己免疫性甲状腺炎などの、臓器に特異的な自己免疫性疾患と

、
輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、および輸血反応などの、輸血に起因する免疫介在性疾患と、

を含む群に包含され、

10

20

30

40

50

該方法は、

該免疫介在性疾患を治療する治療ステップと、

治療法を行う前に、該患者から血液サンプルを採取する第1のステップと、

該血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第2のステップと

、
治療法の開始後に、所定の時間間隔で該患者から1つ以上の血液サンプルを採取する第3のステップと、

第3のステップの該1つ以上の血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第4のステップと、

第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、第4のステップにおいて患者から検出されたサイトカイン B L y S の濃度の値とを比較する第5のステップと、

第5のステップにおける比較から導き出される、第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と第4のステップにおいて検出された B L y S の値との間の、有意な偏差を特定する第6のステップと、

第6のステップにおいて特定された偏差に基づいて、治療的処置に有効性があるとみなす第7のステップと、

を包含する、使用。

【請求項6】

請求項1~5のいずれか一項に記載の使用であって、前記サイトカイン B L y S のアッセイが、

患者を対象とする、前記免疫介在性疾患の主な徴候および症状を特定可能な理学的検査

、
患者を対象とする、1回以上のX線検査、

上記患者から採取された生検用標本の組織学検査、および

上記患者から採取された生検用標本、末梢血液、または骨髄の、分子的な分析からなる群より選択される、1回または複数回の検査のステップと組み合わせられ得る、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、素因、確定診断、臨床経過、および治療有効性のマーカーとしてのサイトカイン B リンパ球刺激因子 (B l y S) の血清学的なアッセイの使用に基づく、免疫に関連した疾患 (例えば臓器に特異的な疾患および輸血反応) の診断的および予測的な管理に関する。

【背景技術】

【0002】

サイトカイン B リンパ球刺激因子 (B l y S) は、“ T N F ファミリーの B 細胞活性化因子 (B A F F) ” としても知られ、1999年に腫瘍壊死因子 (T N F) のスーパーファミリーのメンバーとの相同性に基づいて発見され、その特性が知られるようになった (Schneider P. ら, J Exp Med. 1999;189(11): 1747 ~ 1756、および Nardelli B. ら, Blood. 2001; 97(1):198 ~ 204) 。

【0003】

B L y S は、B細胞の発生および分化を調節する際に鍵となる因子の一つであると現在考えられているので、免疫応答において非常に重要な役割を果たす (Mackay F., Brownin g JL. Nat Rev Immunol 2002;2:465 ~ 475、および Batten M ら, J Exp Med 2000; 192(10): 1453 ~ 1466) 。

【0004】

B L y S は、例えば、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞などの骨髄細胞株によって合成され、膜タンパク質として発現し、主として可溶性の形態で放出される (Huard

10

20

30

40

50

B.ら, *Int Immunol* 2004;16:467~475、およびNardelli B.ら, *Blood*. 2001;97(1):198~204)。

【0005】

近年、このようなサイトカインを分泌することができる一連の細胞種はさらに増加し、非骨髄性細胞(例えば、髄様ストローマの細胞(Gorelik Lら, *J Exp Med* 2003;198:937~945)、滑膜細胞(Ohata J.ら, *J Immunol* 2005;174(2):864~870)、アストロサイト(Markus Krumbholzら, *J Exp Med*. 2005;201(2):195~200)、唾液腺上皮(Ittahlitah M, Miceli-Richard C., Eric Gottenburg Jら, *Arthritis Res Ther*. 2006;8(2):R51)、および腸上皮(Xu W., He B., Chiu A.ら, *Nature Immunol* 2007;8(3):294~303)なども包含するようになった。

10

【0006】

B L y Sは、3つの受容体との相互作用を介してその機能を発揮する。これらの3つの受容体の中でもっとも重要なものはB A F F受容体(B A F F R)であり、Bリンパ球によって独特の様式にて発現する(Ng LGら, *J Immunol*. 2004;173(2):807~817)。B L y SとB A F F Rと結合によって、いくつかの抗アポトーシス因子(B c l 2、B c l - x L、M c l - 1)の発現の増加が誘導される。これにより、成熟B細胞の生存および増殖が促進される(Craxton A,ら, *J Exp Med*. 2005; 202(10): 1363~1374)。

【0007】

B L y Sは、A P R I L(増殖を誘導するリガンド)と呼ばれるT N Fスーパーファミリーの別のメンバーに対して高い相同性を有する(Hahne Mら, *J Exp Med* 1998;188:1185~1190)。このA P R I Lは、3つの受容体のうち2つの受容体、つまり、T A C I(膜貫通型活性化因子およびカルシウム調整シクロフィリンリガンド(transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand))およびB C M A(B細胞成熟抗原)を、B L y Sと共有している(Thompson JS, Schneider P, Kalled SLら, *J Exp Med*. 2002;192(1):129~135、およびSeshasayee D, Valdez P, Yan Mら, *Immunity* 2003;18(2):279~288)。

20

【0008】

B細胞のホメオスタシスにおけるB L y Sの重要性は、マウスのモデルに関する研究によって明らかになった。

【0009】

B L y Sの発現が抑止されたB L y Sノックアウトマウスでは、成熟Bリンパ球のプールの重大な変化が観察される(Gross JAら, *Immunity* 2001;15:289~302)。これに対して、B L y Sを過剰発現するマウス(B L y S遺伝子を導入されたマウス)は、自己免疫性疾患に典型的に見られる特徴を多数発生させる。

30

【0010】

この特徴としては、脾肥大およびリンパアデノ肥大、高血清レベルの自己免疫性抗体(リウマチ因子、抗DNA)、シェーグレン症候群(Sjogren's syndrome; SS)の過程において見られるような、腺構造の破壊および分泌機能の損失をともなう耳下腺のB細胞の浸潤、全身性エリテマトーデス(SLE)に典型的な糸球体腎炎を大いに想起させる腎臓の変化、およびB細胞の異常増殖が挙げられる(Mackay Fら, *J Exp Med*. 1999;190(11):1697~1710、およびThien Mら, *Immunity* 2004;20(6):785~798)。

40

【0011】

このように、実験によって得られた証拠は、B L y Sが生理的なレベルにおいてB細胞の生存および分化を促進するが(Mackay F, Browning JL. *Nat Rev Immunol* 2002;2:465~475)、超生理的な濃度において通常は免疫系によって抑制される自己反応性Bリンパ球を生存および増殖させようであることを示している(Thien Mら, *Immunity*. 2004;20(6):785~798)。

【0012】

この実験的証拠にしたがって、B L y Sの高血清レベルおよび高組織レベルが、最近、いくつかの自己免疫性疾患において記録された。

50

【 0 0 1 3 】

これらの自己免疫性疾患としては、シェーグレン症候群（S S）、関節リウマチ（R A）、全身性エリテマトーデス（S L E）、全身性硬化症（S S c）、多発性硬化症（M S）、混合型クリオグロブリン血症（M C）、およびウエゲナー肉芽腫症などが挙げられる（Stohl W. B Curr Rheumatol Rep 2002;4(4):345~350、Seyler TMら、J Clin Invest. 2005;115(11):3083~3092、Mariette Xら、Ann Rheum Dis. 2003;62(2):168~171、Matsushita Tら、Arthritis Rheum. 2006;54(1):192~201、M. Thangarajら、J Neuroimmunol 2004;152:183~190、Fabris Mら、J Rheumatol 2007;46:37~43、およびM. Krumbholzら、J Autoimmun 2005;25:298~302）。

【 0 0 1 4 】

一般に、これらの自己免疫性疾患において、B L y Sの血清レベルおよび組織レベルは、患部組織（骨膜、唾液腺）における疾患に特異的な自己抗体のレベル、ならびにリンパ球浸潤の存在およびレベルと相関関係にある。特に、異所性の胚中心の形成は、B L y SおよびA P R I Lの存在と相関関係にあるようである（Jonsson MVら、J Clin Immunol 2005;25:189~201、およびSzodoray Pら、Clin Immunol 2005;17:168~176）。

【 0 0 1 5 】

自己免疫性疾患は、大きく2つのサブグループ、つまり全身的な障害と臓器に特異的な障害とに分類することができる。前者は、ヒト生命体全体に対して影響をおよぼす。また、後者は、体の1部分だけに対して特定の様式で影響を及ぼす。B L y Sは、一部の全身的な自己免疫性疾患について徹底的に調べられてきたが、本発明のように臓器に特異的な自己免疫性疾患について調べられていない。

【 0 0 1 6 】

また、例えば免疫グロブリンA（I g A）欠乏症などの、一般的に自己免疫性障害を発症する素因になる免疫不全もある。

【 0 0 1 7 】

自己免疫と適切に関連しないが、臓器の損傷が由来し発生する主要メカニズムを自己免疫と共有する免疫に関連した疾患の中に、免疫に関連した輸血反応がある。免疫に関連した輸血反応としては、血漿または赤血球の不適合に起因し、輸血に伴って起こる可能性のある全ての合併症（例えばスリルハイパーセルミックシンドローム（thrill-hyperthermic syndrome）、アレルギー性反応など）が挙げられるが、特に、輸血後の溶血性反応が挙げられる。近年、自己免疫性疾患に罹患した患者は、一般的な集団と比較して、輸血後に不規則同種抗体の生成量を増加させることが観察された。不規則同種抗体とは、輸血、妊娠、または活動性免疫の獲得の後に、非自己赤血球抗原に対して生成されるか、あるいは、免疫グロブリンもしくは血漿の注入、または臓器もしくは骨髄の移植の後に受動的に獲得される抗体である。同種抗体の存在頻度は、一般的な集団において0.3%~38%の間でばらつきがあり、血液中の同種抗体の検出に使用される新しい方法の感度が増すことによって連続的に増加している。これらの同種抗体は、臨床上的相関性を有する溶血性輸血反応の大半にとっての原因である。

【 0 0 1 8 】

B L y Sのレベルの上昇は、臓器拒絶反応の過程においても見られる。この場合、Tリンパ球に対するB L y SとB A F F Rとの相互作用が、移植した臓器に対抗するT細胞の活性化および増殖を促進する（Ye Qら、Eur J Immunol 2004 ;34 :2750~2759）。M H Cの不適合に起因する心臓移植の拒絶反応マウスのモデルにおいて、B L y S - B A F F Rを遮断すると、移植した臓器の生存が大幅に延長される。

【 0 0 1 9 】

臓器に特異的な自己免疫性疾患（例えば自己免疫性甲状腺炎（A I T D）およびセリアック病（C D）など）において、免疫に関連した輸血反応（I R T R）と同様に、Bリンパ球の役割はまだ明らかにされていない一方で、Tリンパ球の役割の方は比較的よく解明されている。実際に、A I T DおよびC Dは、関連する組織中に浸潤して蔓延したTリンパ球によって特徴付けられており、自己抗原に対する特異性を有するT細胞クローンの活性

10

20

30

40

50

化は、病理学的なプロセスの基礎において常に考慮されてきた。一方、Bリンパ球（浸潤においてめったに説明されない細胞である）による自己抗体の分泌は、診断レベルにおいて非常に重要であるが、病理学的なプロセスの主要なトリガーに対して二次的なものであると考えられている。実際に、CDおよびAITDも、疾患に特異的な循環している自己抗体がない場合に診断可能である。ただし、多数の他の全身的な自己免疫性疾患、例えばRA、SS、SLE、SScなどにおいても、同様の診断上の選択肢を見つけることもできる。しかし、この後者の場合には、Bリンパ球の役割はさらに詳しく解明されている。実際、*in vitro*での実験または動物モデルによって得られた発見に加えて、最近の*in vivo*における、B細胞を除去する治療法のヒトへの導入によって、慢性の病理過程の維持における、病原性の自己抗体の産生細胞としての根本的な役割のみならず、さらにT細胞の集団を活性化する抗原提示細胞としてのBリンパ球の根本的な役割が明らかにされた。自己抗体を産生するB細胞の増殖が、BlySのレベルの増加によって明確に維持されることが、広く実証されている。

10

20

30

40

50

【0020】

自己免疫性甲状腺疾患（AITD）は、本質的には2つの異なる病理主体、すなわち、橋本甲状腺炎（HT）およびグレーブス・バセドウ病（GBD）を含んでいる。慢性リンパ球性甲状腺炎とも呼ばれるHTは、ヒトにおいてもっともよく見られる自己免疫性疾患の一つであり、男性よりも女性の方が多く罹患し（女性：男性 = 18 : 1）、臨床病理学上、いくつかの種類がある。具体的には、甲状腺腫の型（これがもっともよくある種類である）、萎縮性の型（特発性粘液水腫としても知られる）、産後甲状腺炎、および甲状腺機能亢進性“ハシトキシコーシス”である。HTは、CD4+のTリンパ球が甲状腺に顕著に浸潤していることを常に特徴としている。リンパ球は組織化して真性のリンパ濾胞を形成し、甲状腺細胞（つまりその破壊機能の対象）に対して近接する。甲状腺腫のバリエーション、産後甲状腺炎、およびハシトキシコーシスにおいて、甲状腺は肥大し、萎縮性のバリエーションにおいて甲状腺は顕著に萎縮する。最もよく見られる臨床上的症状は、甲状腺機能障害によって甲状腺機能低下症（チアノーゼ；乾燥粘膜；徐脈、筋痙攣；筋無力症；各種浮腫；体重増加；呼吸困難；希発月経；貧血など）と関連している。これは、甲状腺の根本的な成分、例えばサイログロブリン（Tg）および甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）に対する自己抗体が存在することが理由である。一部の患者は、時間の経過とともにTSH受容体（TRAb）を遮断する抗体を形成する。

【0021】

診断は、臨床上的徴候および症状とアッセイとの両方に基づいて行う。アッセイは甲状腺ホルモン（FT4およびFT3）とTSHとについて行うが、前者は疾患の第1の段階において正常であり得る。また、後者はFT4が正常なレベルであっても高い値を示し、この状態は無症候性甲状腺機能低下症であると規定される。抗TPO抗体は、通常患者の90%~95%に見られる。一方、血清の抗サイログロブリン（抗Tg）抗体は、患者の60%~80%において陽性であるが、良好な臨床用マーカーとは考えられておらず、グレーブス・バセドウ病、甲状腺癌、および健康なヒトにも見られる。治療法はステージによって変わる。末期の甲状腺機能低下症に達していれば、治療法は合成T4（レボチオキシン（levo-Thyroxine）、LT4）の連日投与に基づく。甲状腺の機能が正常な甲状腺腫を、LT4を用いて治療することが議論されている。この治療法によって、甲状腺腫の成長を防止し、疾患が進行し甲状腺機能低下症を発症する可能性から患者を護ることができかもしれないが、この課題については広い意見の一致があるわけではない。萎縮性甲状腺炎は、末期の甲状腺機能低下症および粘液水腫に至ることが最も多い型であり、TSHのレベルが非常に高い。さらに、萎縮性甲状腺炎は、多くの場合（症例の20%~50%）、TRAb抗体を有し、そしてTh2疾患を伴うT細胞の増殖によって維持される疾患であると常に考えられてきた。現在、この型の甲状腺炎について明確な診断上の基準はない。LT4の置換療法を無症状のATに罹患した患者に対して用いて、甲状腺の変性の進行を遅らせることが示唆されている。

【0022】

グレーブス・バセドウ病 (G B D) は、刺激活性を有する、 T S H 受容体に対する抗体 (T R A a b) を循環させることによって引き起こされる甲状腺機能亢進症を臨床的な特徴とする、自己免疫性甲状腺疾患である。その病因は未知であるが、そのトリガーとなる環境因子 (ヨウ素摂取の少ない食事、ウイルスの感染、または細菌の感染) と、遺伝的な感受性との間の相互作用に起因すると考えられている。診断は、甲状腺機能亢進症 (高レベルの F T 3 および F T 4 、 T S H の低減、甲状腺機能亢進症に関連する臨床的症状 (頻脈、振戦、体重の減少、発汗など)) および特徴的な抗体 (T R A a b ; 患者の 9 5 % において陽性である) の存在に基づいて行われる。甲状腺腫が存在していることが多く、症例の約 5 0 % において典型的な眼疾患が見られ、症例の 1 % ~ 2 % において特徴的な下肢の皮膚症が見られる。現在の治療は症状の重症度に基づいており、例えば、抗甲状腺活性化薬 (各種チオナミド) を用いた医学療法、 I^{131} を用いた放射線療法、および最後に甲状腺の外科的除去を行う。多くの患者は、医学療法から比較的利益を得る。そして、多くの場合、放射線療法によって生涯にわたる置換療法が必要な甲状腺機能低下症に至る。現在の治療法は全て、症状を治療するが、疾患を治療しない。最近ではリツキシマブが首尾よく使用されている。リツキシマブは、末梢の B 細胞を欠乏させることができる、抗 C D 2 0 モノクローナル抗体である。

10

【 0 0 2 3 】

H T、A T、および G B D は基本的には類似した炎症性自己免疫性プロセスの異なる発現ではないか、また、临床上の出現は特定の患者における免疫応答の範囲を反映しているのではないかと、ということが最近示唆されている。

20

【 0 0 2 4 】

セリアック病において、a - t T G 抗体は、病因および診断の両観点において (特に後者の観点において) 根本的な特徴である (Dieterich W ら, Nat Med 1997;3:797 ~ 801、および Tonutti E ら, J Clin Pathol 2003;56:389 ~ 393) 。

【 0 0 2 5 】

古典的には、活動性セリアック病は、腸内および / または腸外の症状、および a - t T G 抗体の強い陽性を特徴とする。

【 0 0 2 6 】

組織学的には、典型的な形態変化 (つまり、円蓋の過形成および絨毛の萎縮) に関連した、十二指腸および空腸の粘膜の顕著な T リンパ球の浸潤がある。

30

【 0 0 2 7 】

十二指腸および空腸の生検は、診断のための絶好の標準であると考えられるが、実施の際には、分析的な面でも事前分析的な面でもいくつかの問題がある。

【 0 0 2 8 】

セリアック病は、多くの場合、他の自己免疫性疾患、特に I 型糖尿病および橋本甲状腺炎に関連している。

【 0 0 2 9 】

リンパの異常増殖は、セリアック病の最もひどい合併症の一つである。

【 0 0 3 0 】

これらの合併症のうち、腸管 T 細胞リンパ腫が間違いなく最もよく見られ、そして恐ろしいことに、B 細胞リンパ腫も述べられている (Celier C ら, Lancet 2000;356:203 ~ 208) 。

40

【 0 0 3 1 】

リンパ腫は、反応性リンパ球が上皮内に浸潤することから始まり、低悪性度の無痛性増殖を経て、高悪性度のリンパ腫へと転換するように段階的に発展する。高悪性度のリンパ腫は、グルテンを含まない食事および免疫抑制治療を導入した後であっても、吸収が悪い状態を持続的に引き起こす (Cerf-Bensussan N ら, Gut 2002;51:304 ~ 305) 。

【 0 0 3 2 】

セリアック病と混合型クリオグロブリン血症症候群とは (Rodrigo L. World J Gastroenterol 2006;12(41):6585 ~ 6593、および Ferri C ら, J Clin World Pathos 2002;55:4 ~ 1

50

3)、自己免疫の形成につながるメカニズムの研究にとって非常に重要な2つのモデルである。これは、(1)セリアック病において、グルテンに対する応答の変化が、精密な遺伝的設定(HLA DQ2および8)に関連することが、広く証明されている一方、(2)混合型クリオグロブリン血症症候群において、C型肝炎ウイルス(HCV)の感染症が、クリオグロブリンおよび血管炎の形成の原因となる、リウマチ因子陽性の抗体応答を引き起こす上で非常に頻りに役割を果たすことが周知である、という理由による。

【0033】

ただし、最新の証拠は、まさにロトウイルス(Rotavirus)(Troncone R, Au recchio S. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007;44(5):527~528)が原因で起こるウイルス感染症も、セリアック病の病因として重要な役割を果たす可能性があることを示唆している。

10

【0034】

さらに、一部の最も頻発するリンパ増殖性疾患(ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症)の過程における腫瘍性Bリンパ球によるBlySの自己生成が、最近証明された(Chiu Aら, Blood 2007;109(2):729~739, J. Novakら, Blood 2004;104:2247~2253, Kern Cら, Blood 2004;103(2):679~688, Mackay, Tangye SG. Curr Opin Pharmacol. 2004;4(4):347~354, およびMoreaux Jら, Blood 2004;103(8):3148~3157)。

【0035】

一般的な集団と比較すると、自己免疫性疾患は一般に、B細胞のクローン性を発現するリスクが高く、T細胞のクローン性を発現するリスクは低い。この自己免疫性疾患は、進行すると通常のリンパ管の癌になる可能性がある。

20

【0036】

こういったリスクが増加する根本には、遺伝的因子および後天性因子(治療)の両方の因子がいくつか存在する(Quartuccio Lら, Haematologica 2006, 91(5):691~694)。現在、各種自己免疫性疾患の患者において、それが全身的な疾患であれ、あるいは臓器に特異的な疾患であれ、リンパ球のクローン性の発現を予測することができる明確な生物学的マーカーも遺伝的マーカーも存在しない。IgA欠乏症も、特に進行して、拡大した免疫グロブリン欠乏症(extended immunoglobulin deficit)になる場合、この高いリスクを抱えている。

30

【0037】

現在、自己免疫性疾患では、一般的な集団のように、リンパ管の腫瘍形成の主な徴候および症状(リンパアデノ肥大、脾腫、発熱、痒み、体重の減少、無力症、シェーグレン症候群の場合であれば持続性耳下腺の腫脹など)を特定するために、腫瘍形成が進行するリスクを、患者の理学的検査によって臨床的にモニタリングする。この臨床的なモニタリングの方法は、理学的検査の他に、放射線検査(超音波、CT)によっても行われ、さらに放射線検査に対しては、補助的に生検ならびに組織学的検査および分子的な検査(免疫グロブリン遺伝子またはT細胞受容体の高頻度可変領域の増幅)が実施されることもある。

【0038】

セリアック病の過程では、関連するリンパ腫の症状がなくても抗トランスグルタミナーゼ抗体のレベルが持続的に高い場合、たとえグルテンを含まない食事療法が取られていても、リンパ腫の進行の疑いが生じる。これらの場合では、BlySのレベルが持続的に高いことが、リンパ腫が発生する前の状態であることを示唆している可能性があり、そして完全な腫瘍の症状にまで進行することを防止可能な、診断過程および治療過程を示しているかもしれない。我々が現在知る限り、確定診断(diagnostic confirmation)は、信頼できる生検の結果を得ることが難しいために、時期が遅いことが多い。したがって、これらの患者においてリンパ腫の進行を防止して治療することができる可能性は、非常に限定されている。これは、診断が遅れることと、リンパ腫が非常に攻撃的な型であり、現在利用可能な治療法にあまり反応しないこととの両方が原因である。

40

【0039】

50

現在の技術レベルでは、グルテンの役割が広く認識されているセリアック病を除けば、本発明に記載される疾患の病理過程の開始の原因となるトリガー（一般にウイルス性、細菌性、環境性のもの）は、依然ほとんど未知のままである。また、その病理過程の永続化を促進し、認識された疾患が慢性的疾患になるに至る因子を見つける研究が広く行われている。

【 0 0 4 0 】

さらに、臓器に特異的な自己免疫性疾患および免疫不全症において、リンパ管の癌に先立って起こる B / T 細胞のクローン性の発現をモニタリングする有用なマーカーが欠如している。

【 0 0 4 1 】

抗 TNF 抗体を用いて治療中のヒトまたはその治療の対象となる可能性のあるヒトにおいて、癌を発症する素因を決定するために B L y S のアッセイを使用することは、国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 4 5 1 1 号パンフレットによって公知である。これらの薬物は、全身的な自己免疫性疾患において共通して使用されているが、本発明のように臓器に特異的な自己免疫性疾患、輸血反応、または各種免疫性欠乏症における使用に関する理論的な根拠はない。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 4 2 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 4 5 1 1 号パンフレット

【 非特許文献 】

【 0 0 4 3 】

【 非特許文献 1 】 Schneider P. ら, J Exp Med. 1999;189(11): 1747 ~ 1756

【 非特許文献 2 】 Nardelli B. ら, Blood. 2001;97(1):198 ~ 204

【 非特許文献 3 】 Mackay F., Browning JL. Nat Rev Immunol 2002;2:465 ~ 475

【 非特許文献 4 】 Batten M ら, J Exp Med 2000; 192(10): 1453 ~ 1466

【 非特許文献 5 】 Huard B. ら, Int Immunol 2004;16:467 ~ 475

【 非特許文献 6 】 Gorelik L ら, J Exp Med 2003;198:937 ~ 945

【 非特許文献 7 】 Ohata J. ら, J Immunol 2005;174(2):864 ~ 870

【 非特許文献 8 】 Markus Krumbholz ら, J Exp Med. 2005;201(2):195 ~ 200

【 非特許文献 9 】 Ittahltah M, Miceli-Richard C., Eric Gottenburg J ら, Arthritis Res Ther. 2006;8(2):R51

【 非特許文献 1 0 】 Xu W., He B., Chiu A. ら, Nature Immunol 2007;8(3):294 ~ 303

【 非特許文献 1 1 】 Ng LG ら, J Immunol. 2004;173(2):807 ~ 817

【 非特許文献 1 2 】 Craxton A, ら, J Exp Med. 2005; 202(10): 1363 ~ 1374

【 非特許文献 1 3 】 Hahne M ら, J Exp Med 1998;188:1185 ~ 1190

【 非特許文献 1 4 】 Thompson JS, Schneider P, Kalled SL ら, J Exp Med. 2002;192(1): 129 ~ 135

【 非特許文献 1 5 】 Seshasayee D, Valdez P, Yan M ら, Immunity 2003;18(2):279 ~ 288

【 非特許文献 1 6 】 Gross JA ら, Immunity 2001;15:289 ~ 302

【 非特許文献 1 7 】 Mackay F ら, J Exp Med. 1999;190(11):1697 ~ 1710

【 非特許文献 1 8 】 Thien M ら, Immunity 2004;20(6):785 ~ 798

【 非特許文献 1 9 】 Stohl W. B Curr Rheumatol Rep 2002;4(4):345 ~ 350

【 非特許文献 2 0 】 Seyler TM ら, J Clin Invest. 2005;115(11):3083 ~ 3092

【 非特許文献 2 1 】 Mariette X ら, Ann Rheum Dis. 2003;62(2):168 ~ 171

【 非特許文献 2 2 】 Matsushita T ら, Arthritis Rheum. 2006;54(1):192 ~ 201

【 非特許文献 2 3 】 M. Thangaraj ら, J Neuroimmunol 2004;152:183 ~ 190

【 非特許文献 2 4 】 Fabris M ら, J Rheumatol 2007;46:37 ~ 43

【 非特許文献 2 5 】 M. Krumbholz ら, J Autoimmun 2005;25:298 ~ 302

【 非特許文献 2 6 】 Jonsson MV ら, J Clin Immunol 2005;25:189 ~ 201

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 2 7】Szodoray Pら, Clin Immunol 2005;17:168 ~ 176
- 【非特許文献 2 8】Ye Qら, Eur J Immunol 2004 ;34 :2750 ~ 2759
- 【非特許文献 2 9】Dieterich Wら, Nat Med 1997;3:797 ~ 801
- 【非特許文献 3 0】Tonutti Eら, J Clin Pathol 2003;56:389 ~ 393
- 【非特許文献 3 1】Celier Cら, Lancet 2000;356:203 ~ 208
- 【非特許文献 3 2】Cerf-Bensussan Nら, Gut 2002;51:304 ~ 305
- 【非特許文献 3 3】Rodrigo L. World J Gastroenterol 2006;12(41):6585 ~ 6593
- 【非特許文献 3 4】Ferri Cら, J Clin World Pathos 2002;55:4 ~ 13
- 【非特許文献 3 5】Tronccone R, Aurecchio S. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007;44(5):527 ~ 528
- 【非特許文献 3 6】Chiu Aら, Blood 2007;109(2):729 ~ 739
- 【非特許文献 3 7】J. Novakら, Blood 2004;104:2247 ~ 2253
- 【非特許文献 3 8】Kern Cら, Blood 2004;103(2):679 ~ 688
- 【非特許文献 3 9】Mackay, Tangye SG. Curr Opin Pharmacol. 2004;4(4):347 ~ 354
- 【非特許文献 4 0】Moreaux Jら, Blood 2004;103(8):3148 ~ 3157
- 【非特許文献 4 1】Quartuccio Lら, Haematologica 2006, 91 (5) :691 ~ 694

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0044】

このような背景において、本発明の目的の1つは、免疫介在性疾患の診断を確定するためにサイトカインBリンパ球刺激因子(BLyS)の血清学的なアッセイを使用して、免疫介在性疾患を示唆する状況にある場合および/または免疫介在性疾患が疑われる場合および/または免疫介在性疾患の素因(細菌の感染、免疫不全症、HLA遺伝子に基づく遺伝的素因)がある場合に現在使用されている手法の限界を解消することである。なお、この免疫介在性疾患としては、臓器に特異的な自己免疫性疾患(セリアック病、自己免疫性甲状腺炎)、および免疫介在性の輸血反応(輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応)が挙げられる。

20

【0045】

本発明の別の目的は、サイトカインBLySのアッセイを、鑑別診断において産後の鬱病と区別される産後の甲状腺炎が発生するリスクのマーカーとして使用することである。

30

【0046】

本発明のさらに別の目的は、サイトカインBLySのアッセイを、急性甲状腺炎および萎縮性甲状腺炎の過程において予測用マーカーとして使用することである。

【0047】

本発明のさらに別の目的は、サイトカインBLySのアッセイを、輸血を行う可能性のある患者、特に活動性の免疫介在性疾患の患者において輸血反応のリスクのマーカーとして使用することである。

【0048】

本発明のさらに別の目的は、個別化された治療法を選択するための方法として、治療(例えば、セリアック病の患者におけるグルテンを含まない食事)を守っているかどうかをモニタリングするための方法として、疾患における症状の面だけではなく疾患の生物学的なレベル(高レベルのBLySが、治療後に正常な範囲に戻る)においても有効な治療法をスクリーニングするための方法として、サイトカインBLySのアッセイを使用して、現在使用されている手法の限界を解消することである。ここで、この疾患としては、臓器に特異的な自己免疫性疾患(セリアック病、自己免疫性甲状腺炎)、IgA欠乏症、および輸血反応などが挙げられる。

40

【0049】

本発明のさらに別の目的は、BLySの血清学的なアッセイを、臓器に特異的な自己免疫性疾患(セリアック病、自己免疫性甲状腺炎)および免疫グロブリン欠乏症を包含する免疫介在性疾患における、B細胞のクローン性およびT細胞のクローン性の診断および予

50

測のために使用して、現在使用されている手法の限界を解消することである。

【0050】

本発明のさらに別の目的は、臓器に特異的な自己免疫性疾患および免疫グロブリン欠乏症の過程において、B細胞のクローン性およびT細胞のクローン性を防止および治療する革新的な治療方法を実現するために、B L y Sをマーカーとして使用することである。

【0051】

現在の技術の短所を解消し、上記目的およびその他の目的を達成して長所を実現するために、出願人は、本発明について研究し、試験を行い、そして本発明を具現化した。

【課題を解決するための手段】

【0052】

本発明を独立項において規定し、その特徴を記述する。一方で、従属項には、本発明の他の特徴、または主な発明的発想の変形例を記載する。

【0053】

B細胞の集団に関する証拠およびB L y Sの存在に関する証拠は、本明細書に記載される臓器に特異的な自己免疫性疾患および免疫に関連した輸血反応において、全く欠如していた。したがって、B L y Sがこれらの障害においても重要な病原的な役割を有するということは、有望な説明ではないようであった。この仮説は、全身的な自己免疫性疾患の知見および経験から得られる顕著な科学的背景を、関連することが多い臓器に特異的な自己免疫性疾患、免疫不全症、および輸血反応の独特の特徴の調査と総合することによって形成されている。このプロセスは、共同発明者らの異なる専門知識を体系的に統合することから得られた。

【0054】

臓器に特異的な自己免疫性疾患（セリアック病および自己免疫性甲状腺炎）、I g A 欠乏症、および輸血反応に関する予備的な研究から発明者らによって得られた結果は、共同発明者らが、これらの免疫に関連した疾患の診断的および予測的な管理に用いる、新しい有用なマーカーとしてB L y Sを見出すことにつながった。特に、B L y Sは、疾患のリスクおよび/または素因を示すマーカーとして、疾患の重症度および疾患がB / T細胞のクローン性であることの指標として、治療法を遵守しているかどうか検証する方法として、そして症状についてだけでなく、疾患の生物学的特徴についても有効な新しい治療方針のスクリーニングを検証する方法として、現れた。

【0055】

上述の目的に従って、本発明の1つの特徴は、免疫介在性疾患を示唆する臨床的症状を有する、および/または免疫介在性疾患の物理的もしくは生化学的な検査を受けている、または免疫介在性疾患が疑われる状況にある、患者において、あるいは免疫介在性疾患の重大な素因（慢性の細菌感染症、I g A 欠乏症、遺伝的素因、家族特性）を有する患者において、サイトカインBリンパ球刺激因子（B L y S）の血清学的なアッセイを、臓器に特異的な自己免疫性疾患（例えばセリアック病、自己免疫性甲状腺疾患など）と輸血に関連した免疫介在性疾患（例えば輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応など）とを包含する免疫介在性疾患の診断を確定するマーカーとしての、以下の方法における使用に関する。この方法は、

遠心分離によって血清が得られ得る血液サンプルを、この患者から採取する第1のステップと、

市販のキットを典型的に使用することによって、この血清サンプルを検査して、サイトカインB L y Sの濃度を決定する第2のステップと、

第2の段階において決定されたサイトカインB l y Sの濃度と、健康な集団について前もって得られたサイトカインB l y Sの濃度の参照値とを比較する第3のステップと、

第3のステップにおける比較から導き出される、第2の段階において決定されたサイトカインB l y Sの濃度と健康なコントロールの集団について前もって得られたサイトカインB l y Sの濃度の参照値との間の、有意な偏差を特定して、上述の免疫介在性疾患の一つに罹患した患者を選択する第4のステップと、

10

20

30

40

50

免疫介在性疾患の一つに罹患したとして選択された患者の、第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B l y S の濃度と、サイトカイン B l y S の濃度の1つ以上の参照値（なお、これらの参照値は、特定の免疫介在性疾患に罹患した、および/または活動性疾患またはその特定の過程の診断が確立された、一連の患者について前もって得られた B l y S のベンチマークの範囲内である。）とを比較する第5のステップと、

第5のステップにおいてなされた比較に基づいて、上述の免疫介在性疾患の1つ以上の確定的な疾患の診断を行う第6のステップと、
を包含する。

【0056】

本発明の別の革新的な特徴は、疾患における、サイトカイン B リンパ球刺激因子（B l y S）の診断用マーカーとしての使用、特に B l y S のアッセイの上述の方法における使用である。ここで、この疾患は、B細胞ではなくT細胞が、病的浸潤における主要な成分であり、かつこれまでに特定された発病のメカニズムにおける主要な成分であるため、発病におけるこのサイトカインの役割が容易に考えられない疾患である。

【0057】

関連する病棟の設備またはこの病棟を構成する構造物に大幅な修正を加える必要がなく、通常大規模な病院の分析ラボに存在する型の免疫学的な酵素アッセイ（酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A））を実施可能な自動装置を、患者の血清中における B l y S の濃度を分析するために第2のステップにおいて使用することは、本発明の利点である。

【0058】

本発明はさらに、臓器に特異的な自己免疫性疾患（自己免疫性甲状腺炎、セリアック病）および免疫不全症（例えば I g A 欠乏症、分類不能型免疫グロブリン欠乏症）を包含する、患者の免疫介在性疾患の過程において、B/T細胞のクローン性の発現の開始を経時的にモニタリングする方法における B l y S の使用に関する。この方法は、

この患者から血液サンプルを採取して血清を得る第1のステップと、

この血清サンプルを検査して、サイトカイン B l y S の濃度を決定する第2のステップと、

第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B l y S の濃度と、患者から前もって検出された1つ以上の B l y S の値とを比較する第3のステップと、

第3のステップにおける比較から導き出される有意な偏差（すなわち、第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B l y S の濃度と患者から前もって検出された1つ以上の B l y S 値との間の、有意な増加）を特定する第4のステップと、

B l y S の存在または第4のステップにおいて検出された有意な偏差に従って、上述の免疫介在性疾患の過程において、B細胞のクローン性またはT細胞のクローン性が発現する潜在的なリスクまたはB細胞のクローン性またはT細胞のクローン性に向かって疾患が進行する潜在的なリスクが発生するとみなす（attributing）第5のステップと、

第5のステージにて実施したアサイメント（assignment）の結果に基づいて、第1のステップから第5のステップを所定の時間間隔で繰り返すことを決定する第6のステップと、

を包含する。

【0059】

この場合、セリアック病の患者の食事療法の有効性、免疫系の活性化マーカー、臓器機能性のマーカー（F T 4、F T 3、T S H、自己免疫性甲状腺炎における特定の自己抗体）、患者の末梢血液または骨髄におけるBリンパ球またはTリンパ球のクローン増殖、理学的検査、患者に対するX線検査または生検などを経時的に評価することができる。なお、患者の末梢血液または骨髄におけるBリンパ球またはTリンパ球のクローン増殖は、分子生物学的な手法を使用することによって経時的に評価することができる。

【0060】

本発明の別の特徴によれば、免疫介在性疾患を予測する方法（つまり、免疫介在性疾患の、発病のリスク、過程、重症度、治療法に対する良好な応答などを予測する方法）にお

10

20

30

40

50

ける、サイトカイン B L y S アッセイの予測用マーカーとしての使用が提供される。この免疫介在性疾患としては、臓器に特異的な自己免疫性疾患（例えばセリアック病、自己免疫性甲状腺炎など）、および輸血に関連した免疫介在性疾患（例えば、輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応）が挙げられる。この方法は、

- i) 慢性の細菌感染症（肝炎ウイルス、疱疹ウイルス、クラミジアなど）の存在
- i i) 疾患の発病のプロセスまたは一般に使用される治療法の対象における、特定の H L A の遺伝子型 / または重要な因子をコードする遺伝子の存在、
- i i i) 甲状腺腫を伴う、または伴わない無症候性甲状腺機能低下症、
- i v) 産後の鬱病および / または産後の甲状腺機能低下症、
- v) 1 つ以上の活動性の免疫介在性疾患の存在、
- v i) 輸血の必要性、および、
- v i i) 新しい治療法の開始

のうちの 1 つ以上の状況によって特徴付けられる患者、を選択する予備的なステップと、
選択された患者から血液サンプルを採取する第 1 のステップと、

この血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第 2 のステップと、

第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、サイトカイン B L y S の濃度の 1 つ以上の参照値とを比較する第 3 のステップと、

第 3 のステップから導き出される、第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と第 3 のステップにおいて考慮される参照値との間の、有意な偏差を特定する第 4 のステップと、

上述の免疫介在性疾患について第 4 のステージにおいて特定された偏差に従って、予測を行う第 5 の段階と、
を包含する。

【 0 0 6 1 】

本発明の別の特徴によれば、免疫介在性疾患（例えば臓器に特異的な自己免疫性疾患（例えばセリアック病、自己免疫性甲状腺炎）、輸血に関連した免疫介在性疾患（例えば輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応）、および免疫不全症（例えば I g A 欠乏症、分類不能型免疫グロブリン欠乏症））に有効な新しい治療法をスクリーニングするための方法としての、サイトカイン B L y S のアッセイを使用することが提供される。

【 0 0 6 2 】

この目的を達成するために、治療の間に、B L y S の血清学的な濃度のモニタリングを好適に使用して、B L y S の血清レベルが正常範囲に包含されるレベルにまで実際に減少することによって示された、疾患の生物学的現象についての有効性を検証することができる。あるいは、免疫介在性疾患に罹患した患者の治療的処置の有効性を制御する方法におけるマーカーとして、B L y S のアッセイを使用することができる。この方法は、

新しい治療法を行う前に、この患者から血液サンプルを採取して血清を得る第 1 のステップと、

この血清のサンプルを検査して、サイトカイン B l y S の濃度を決定する第 2 のステップと、

新しい治療法の開始後の所定の時間（例えば、1、3、6、12 ヶ月後）に患者から血液サンプルを採取する第 3 のステップと、

第 3 のステップにおいて採取された 1 つ以上の血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第 4 のステップと、

第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B l y S の濃度と、第 4 のステップにおいて決定されたサイトカイン B l y S の濃度とを比較する第 5 のステップと、

第 5 のステップにおける比較から導き出される、第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B l y S の濃度と第 4 のステップにおいて得られるサイトカイン B l y S の濃度の値との間の、有意な偏差を特定する第 6 のステップと、

10

20

30

40

50

第6のステップにおいて特定された偏差に基づいて、新しい治療法に有効性があるとみなす第7のステップと、
を包含する。

【0063】

本発明は、免疫介在性疾患（臓器に特異的な自己免疫性疾患および輸血反応の両方が挙げられる）に罹患した患者の、診断手法および予測手法の改善、ならびに治療を目的としたモニタリングの改善を可能にする。

【0064】

本発明は、免疫介在性疾患（自己免疫性甲状腺炎、セリアック病、および免疫不全症（例えばIgA欠乏症）が挙げられる）の過程における、B細胞のクローン性およびT細胞のクローン性の診断および予測に使用するために、特に有効である。

10

【0065】

本発明の変形例によれば、本発明に係るBlySのアッセイの使用は、患者を対象とする、特定の疾患の主な徴候および症状が特定可能な理学的検査、患者を対象とする、1回以上のX線検査、患者から採取された生検用標本の組織学検査、および患者の生検用サンプル、末梢血液、または骨髄の分子生物学的検査、の1つ以上の分析方法と組み合わせられ得る。

【0066】

上記およびその他の本発明の特徴は、実施形態の好適な態様についての以下の記載から明らかになる。ただし、これらの実施形態は、添付の図面を参照する非制限的な例として与えられている。

20

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】図1は、健康な血液提供者（HBD）に対して、セリアック病の患者（CD）における血清Bリンパ球刺激因子（BlyS）のレベルを比較するグラフである（正常域： $< 1.145 \text{ ng/ml}$ 、平均 $+ 2SD$ ）。

【図2】図2は、セリアック病の患者における、サイトカインBリンパ球刺激因子（BlyS）の濃度と抗体a-tTGの濃度との間の、有意な相関を示すグラフである。

【図3】図3は、セリアック病の患者においてグルテンを含まない食事療法（gluten-free diet；GFD）を実施した後の、Bリンパ球刺激因子（BlyS）の濃度の有意な減少を示すグラフである（ $1.619 \pm 0.410 \text{ ng/ml}$ から $1.283 \pm 0.310 \text{ ng/ml}$ へ減少；* $p = 0.0122$ 、ウィルコクソン符号順位検定）。

30

【図4】図4は、健康な血液提供者（HBD）に対して、IgADの患者において、全体（IgAD tot）の場合および2つのサブグループに分けた場合の、血清Bリンパ球刺激因子（BlyS）のレベルを比較するグラフである。2つのサブグループとは、セリアック病に罹患したIgADの患者（IgAD+CD）と、CDに罹患していないIgADの患者（IgAD）とである（正常域： $< 1.145 \text{ ng/ml}$ 、平均 $+ 2SD$ ）。

【図5】図5は、健康な血液提供者（HBD）に対して、自己免疫性甲状腺炎（AITD）の患者において、全体的場合および橋本甲状腺炎（HT）とグレーブス病/バセドウ病（GBD）とを区別した場合の、血清中のBlySのレベルを比較するグラフである（正常域： $< 1.145 \text{ ng/ml}$ 、平均 $+ 2SD$ ）。

40

【図6】図6は、FT4の正常なレベルまたはFT4の低いレベルを有するHT患者において、血清中のBlySのレベルを比較するグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0068】

本発明は、サイトカインBリンパ球刺激因子（BlyS）について当該技術分野において公知であることを基礎とし、臓器に特異的な自己免疫性疾患（セリアック病、自己免疫性甲状腺炎）、免疫不全、および免疫介在性輸血反応を包含する、免疫に関連した疾患を診断および予測するための、このようなサイトカインの血清学的なアッセイの革新的な

50

使用を完成させる。

【0069】

特に、出願人が得た実験結果は、複数の免疫に関連する病状（セリアック病、I g A 欠乏症、自己免疫性甲状腺炎、免疫介在性輸血反応など）における B L y S の発現および役割に関するものである。これらの病状は、特定の臓器の症状の原因となる免疫介在性応答によって、自己抗体の分泌によって、これら疾患同士の高い相関性および他の自己免疫性疾患との高い相関性によって、および B 細胞のクローン性または T 細胞のクローン性が発現するリスクの増加によって特徴付けられている。また出願人が得た実験結果は、これらの病状における新しい診断用、予測用、および治療用のマーカーとして B L y S を特定し提案することへと導いた。

10

【0070】

さらに、これらの病状において得られた結果に基づいて、本発明は、将来 B L y S が特定される可能性のある、他の全ての免疫介在性障害にも拡張され得る。

【0071】

混合型クリオグロブリン血症症候群における上述の B L y S の研究結果によって、出願人は、このようなサイトカインが発見されて以降初めて、C 型肝炎ウイルス（H C V）感染症による B L y S の発現の上方制御における有望で重要な役割を特定すること、および同様のメカニズムを有する他のウイルスは同じ効果を生じさせると仮定することができるようになった。本発明の対象となる臓器に特異的な自己免疫性疾患において、依然未知であるが、細菌の感染（おそらくウイルスの感染）が病理過程を引き起こすという重要な役割を果たす。出願人は、H C V 感染症そのものが、B L y S の発現の増加を誘発し、クリオグロブリン血症症候群が現れるまで、素因を有する被験者のサブセットにおいて自己反応性 B 細胞の増殖を維持することに寄与できることを示した。ただし、クリオグロブリン血症症候群に罹患した患者の血清における B L y S の値が慢性の H C V 感染症だけに罹患した被験者よりも非常に高いという条件下において、この症候群の発生は、B L y S の発現がさらに増加することとタイミングが一致した（Fabris M ら, J Rheumatol 2007; 46:37~43）。

20

【0072】

これらの前提において、出願人は、セリアック病および自己免疫性甲状腺炎においても、B L y S のレベルが増加すると仮定した。

30

【0073】

この効果は、主に内因性の（endogen）抗ウイルス応答によって、つまりインターフェロンによって媒介される。なお、インターフェロンは、種々の研究によってインビトロにおいて B L y S の発現を強力に誘発することが示されている。

【0074】

セリアック病の病因における、B リンパ球の役割は、H L A および T リンパ球の活性化が果たす根本的な役割と比較すると、これまでは非常に小さいと考えられてきた（LM Sol lid, Thorsby E. Gastroenterology 1993; 105: 910~922, Spurkland A ら, Tissue anti gens 1997 ; 49:29~34, および Molberg ら, Gastroenterology 2003; 125:337~344）。しかし、出願人は、セリアック病に罹患した患者において高い割合（> 80%）で、B L y S が高血清レベルにて見出される事を示した（図 1）。

40

【0075】

特に、図 1 は、セリアック病の患者における B L y S の血清レベルを、健康なコントロール（H B D とともに表記され、年齢および性別において調査対象の患者に匹敵する健康な被験者、つまり血液提供者からなるコントロール）と比較して示している。B L y S の血清レベルは、健康なコントロールと比べて、セリアック病の患者において非常に高い（マンホイットニーの t 検定、* p < 0 . 0001）（正常域：< 1 . 145 ng / ml、平均 + 2 S D）。

【0076】

ここで初めて明らかにされるこの結果は、この広く見られる（集団の約 1 . 1%）腸疾

50

患の病因の解釈における新しい鍵を暗示している。特に重要であることは、B L y Sがこれまで研究されてきた自己免疫性障害の全てと比べても、B L y Sの上方制御は、セリアック病において最も広く記録されている（5人中4人の患者）ことである。さらに、出願人が測定および分析したB L y Sの血清レベルは、この疾患に特異的な抗体である抗トランスグルタミナーゼ（a - t T G）の血清レベルと有意な相関があることを示している（図2参照。同図はB L y Sの血清レベルとa - t T G I g Aレベルとの相関関係を示している。スピアマンの順位試験： $r = 0.399$ 、95% C I： $0.1724 \sim 0.5856$ 、 $p = 0.0007$ ）。また、B L y Sとa - t T Gとの両方が、グルテンを含まない食事療法の導入および疾患の臨床上の寛解と同時に減少している（図3を参照。同図は、グルテンを含まない食事療法の開始後の、B L y Sの血清レベルの制御を示している。）。12人中8人（75%）の患者において、食事療法後のB L y Sのレベルが依然正常域より高いものを用いたアッセイ）、食事療法後のB L y Sのレベルには、一般に有意な減少が見られる（ $1.619 \pm 0.410 \text{ ng/ml}$ から $1.283 \pm 0.310 \text{ ng/ml}$ へ減少；* $p = 0.0122$ 、ウィルコクソン符号順位検定）（ $> 1.145 \text{ ng/ml}$ 、エサイザのキット（R&D Systems社のクアントカインE L I S Aキット（Quantki ne ELISA kit），Minneapolis, 55413 USA））。

10

【0077】

ただし、a - t T Gが陰性になり臨床上寛解に到達する症例であっても、B L y Sのレベルは大幅に減少したものの、正常域には達していない。このことは、疾患が無症候状態のまま継続すること、または疾患の素因になり、広く共有され、H L Aの遺伝子型に相当するB L y Sの基礎レベルが比較的高いことを示唆している。

20

【0078】

感染力を有する共同参加物（co-participation）（ロタウイルス）がセリアック病の病因において関与している可能性を示す最近の根拠からは、クリオグロブリン血症症候群において観察されたことと同じように、B L y Sの血清レベルの上昇について別の仮説が立てられる。

【0079】

したがって、B L y Sのアッセイは、非典型的な症状のある場合、陰性のa - t T Gの血清レベルをともなった場合、あるいは腸生検が実施不可能、または倫理的に薦められない場合などの疑わしい場合や、前記のような上記疾患に罹患するリスクが比較的高い個体の集団におけるスクリーニングとしても、さらなる診断上のツールとなる。

30

【0080】

さらに、高いB L y Sの血清レベルが全身的に継続すると、遺伝的に素因を有する個体において、他の自己免疫性疾患に対する罹患を促進する可能性がある。これは、B L y Sが、初期のトリガーおよびクローンの集団の形成から逃れるまで、その強力な抗アポトーシス効果によって、膨張したB細胞において遺伝子の変異をさらに促進することと同様である。

【0081】

出願人が前もって分析した混合型クリオグロブリン血症症候群の66人の患者において、高いレベルのB L y Sと有意な相関性を示した臨床上の特徴は、クローナルB細胞の増殖の存在だけであった。B細胞のクローン性の患者は、B細胞のクローン性を有しない患者と比較すると、非常に高いB L y Sのレベルを示した被験者の割合が有意に高かった（9.8%に対して33.3%；OR = 4.6、CI = 1.12 ~ 18.96、 $p = 0.04$ ）。

40

【0082】

これらの症例では、各種B細胞腫瘍（ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病）、およびさらに最近では一次的SS（primary SS）の患者の唾液腺に浸潤するBリンパ球（C Daridonら，Arthritis Rheum 2007；56:1134 ~ 1144）において見られるように、B細胞のクローンも自己分泌刺激メカニズムによって、B L y Sを分泌し、疾患に寄与するのかもしれないと考えることもできる。

50

【 0 0 8 3 】

B L y S は、クリオグロブリン血症および S S の過程、ならびに複数の腫瘍性障害において先に示したように、多段階プロセスにおいて重要な役割を果たし得る。このプロセスは、セリアック病においてもリンパ腫の形成を引き起こす。実際に、このプロセスは B 細胞および T 細胞の両方を刺激する (Mackay F, Leung H. *Semin Immunol.* 2006;18(5):284-289)。びまん性大細胞型 B 細胞腸リンパ腫を伴うセリアック病の患者において、出願人が非常に高いレベル (8.5 ng/ml) の B L y S を発見したことは、この仮説と矛盾しない。

【 0 0 8 4 】

したがって、この結果は、B L y S のアッセイを、B / T 細胞のクローン性が疑われる (グルテンを含まない食事療法を厳格に遵守しているにもかかわらず、高い a - t T G レベルが継続している) セリアック病の患者の症例の補助的診断法として使用することが可能であることを示唆している。

10

【 0 0 8 5 】

選択的な原発性 I g A 欠乏症 (I g A D) は、免疫不全症のもっともよく見られる型であり、白人における推定発生率は 1 : 6 0 0 である。I g A 単独欠損症の個体は、正常な I g A 遺伝子を有するが、リンパ球の最終分化に欠陥を有しており、このことが血清およびムコサル I g A の生成不足を引き起こす (Cunningham-Rundles C. *J Clin Immunol* 2001;21(5):303~309)。I g A D に関連して多数の疾患、例えば、アレルギー、胃腸管および再発上気道の疾患、特に、自己免疫性疾患が報告されている (Liblau RSら, *Int Arch Allergy Immunol* 1992;99(1):16~27)。最もよく見られる相関はセリアック病 (C D) との相関であり、C D は通常、I g A D 患者において明らかに欠如している、特定の I g A 抗体を検出することによって診断されるので、特に重要である。図 4 に示すように、出願人は、コントロール ($0.66 \pm 0.24 \text{ ng/ml}$; $p < 0.0001$) よりも I g A D 患者 ($1.57 \pm 0.51 \text{ ng/ml}$) において B L y S の血清レベルが有意に高いことを見出した。特に、I g A D 患者の 77.8% (35 人 / 45 人) が、正常域を超えた B L y S のレベル ($> 1.14 \text{ ng/ml}$) を有している。分析対象の I g A D 患者のうち、26 人がセリアック病 C D に罹患していたが、I g A D およびセリアック病 C D の患者 19 人と比べて大きな違いがなかった ($1.67 \pm 0.57 \text{ ng/ml}$, $p = n s$ に対して $1.49 \pm 0.46 \text{ ng/ml}$)。I g A D 患者と、C D に罹患しているが、I g A が正常である上述した一連の患者との間では、B L y S のレベルの差は見られなかった ($1.54 \pm 0.46 \text{ ng/ml}$)。したがって、B L y S は、I g A D の患者において上方制御され、I g A D と自己免疫性疾患とを強く関連付ける因子の一つである可能性があるが、B 細胞のクローン性を形成するリスクを増加させる因子の一つである可能性もある。本発明では、B L y S のアッセイを、I g A D に罹患した被験者における B 細胞のクローン性の形成の予測用マーカーとして革新的に使用する。

20

30

【 0 0 8 6 】

自己免疫性の甲状腺疾患 (A I T D) は、よく見られる自己免疫性疾患であり、一般人口の罹患率は 5% に上る。また、女性のほうが男性よりも罹患率が高い。甲状腺に指向する自己免疫 (thyroid-directed autoimmunity) は、橋本甲状腺炎 (H T) およびグレーブス・バセドウ病 (G B D) の、2 つの古典的自己免疫性症状において現れる。前者は、甲状腺機能低下症 (抗 T P O および抗サイログロブリン) の原因となり、後者は甲状腺機能亢進症 (T S H 受容体のアゴニストの自己抗体) の原因となる。A I T D は、他の自己免疫性疾患 (セリアック病、1 型糖尿病、全身的コネクティバイティス (systemic connectivitis)) と関連することが多い。A I T D は、おそらく共通の自己免疫を誘発する表現型を共有しているのであろう。他の自己免疫性疾患のように、A I T D は、B 細胞クローナル疾患 (特に H T 患者) の発生リスクを増加させる。

40

【 0 0 8 7 】

図 5 に示すように、出願人は、77 人の白人の A I T D 患者 (内訳、男性 10 人および女性 67 人、平均年齢 48.2 ± 16.1 歳、H T 患者 52 人および G B D 患者 25 人)

50

を研究し、B L y Sの血清レベルを、77人の年齢および性別が一致する健康なコントロールと比較して分析した。A I T D患者は、B L y Sのレベルにおいて有意な増加を示した ($p < 0.0001$)。G B D患者は、H T患者よりも高いB L y Sを示す傾向があった ($p = 0.06$)。H TおよびG Dのどちらにおいても、B L y Sのレベルと自己抗体との間の有意な相関性は見られなかった。一方で、B L y SとF T 4の間では、正の相関性が見られた ($r = 0.31$; $p = 0.012$)。さらにその一方で、T S H ($r = -0.45$; $p = 0.0002$)の場合は、逆の相関性が見られた。

【0088】

実際、H T患者において、F T 4のレベルが正常である患者は、甲状腺機能低下症患者に比べてB L y Sが非常に高い (* $p = 0.0396$) (図6)。

10

【0089】

出願人は、B L y SのレベルがA I T Dの患者において高いことを本発明において初めて仮定し、かつ見出した。このことは、これらの自己免疫性障害においても、B L y Sが病因としての重要な役割をしていることを示唆している。全身的自己免疫性疾患 (R A、S S、L E S) において先行する実証より革新的な様式において、B L y Sのレベルは、甲状腺の機能性とは相関性を有するが、自己抗体の分泌とは相関性を有していない。したがって、B L y Sは、H Tの甲状腺機能が正常な第1の段階において比較的高く、甲状腺活性化のマーカーとして (自己抗体を分泌するプラズマ細胞のマーカーとしてではない) G B Dにおける甲状腺機能亢進症のレベルと相関性を有する。甲状腺がその機能を喪失すると (临床上は甲状腺機能低下症によって顕在化する)、B L y Sは減少する。また、B L y Sの過剰発現は、他の自己免疫性疾患またはリンパ増殖性疾患を発症するA I T Dの患者の割合の増加を説明する可能性のある、メカニズムの一つを表わしているのかもしれない。

20

【0090】

以上のように、本発明は、A I T Dの患者における治療の有効性の診断、予測、およびスクリーニングのためのB L y Sの血清学的なアッセイの使用を提案する。

【0091】

自己免疫性疾患の患者は、一般的な集団に比べて、輸血後に不規則同種抗体を生成する傾向が高いことが、最近観察されている。輸血反応の発生を予測できる公知のマーカーは、今のところ存在しない。自己免疫性疾患と免疫介在性のメカニズムとの関連に基づいて、出願人は、サイトカインB L y Sも輸血反応において役割を有する可能性があることを考えるに至った。この目的のために、ウディネ大学病院、血液製剤配布実験室の5人の患者に対して予備研究を行った。これらの5人の患者の内訳は、輸血を繰り返し行ったにもかかわらず同種抗体/自己抗体の形成を示さない患者 (p t s A型) が2人と、高濃度の赤血球を複数単位にて輸血した後に同種抗体/自己抗体を形成した患者が3人 (p t s B型) である。同種抗体/自己抗体反応のある患者 (B型) では、反応のない患者 (A型) に比べて、B L y S / B A F Fのレベルが高い傾向があった (平均値で、 1.29 ng/ml に対して 2.48 ng/ml)。また、全てのB型の患者が、正常な閾値より高いB L y Sのレベルを示した ($> 1.14 \text{ ng/ml}$)。

30

【0092】

したがって、本発明は、以下の状況において、血清B L y Sのアッセイを革新的な様式にて提供する。

40

i) 以下に列挙する疾患を包含する免疫介在性疾患の過程における、診断用/予測用マーカー (確定、重症度、過程、B細胞/T細胞のクローン性) および治療効果のスクリーニング。すなわち、

例えば、セリアック病、橋本甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎、産後甲状腺炎、グレーブス・パセドウ病などの、臓器に特異的な自己免疫性疾患、

例えば、輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応などの、輸血に関連した免疫介在性疾患、および、

例えば、I g A 欠乏症、分類不能型免疫不全症などの、免疫不全症。

50

【 0 0 9 3 】

したがって、患者の免疫介在性疾患における診断および/または予測および/または効果的な治療法のスクリーニングに対して適用される本発明は、以下のステップを包含する。すなわち、

患者の血清を得るための血液サンプルを採取するステップと、

この血清サンプルを検査して、濃度を決定するステップ、すなわちエッセイの技術を用いたサイトカイン B L y S のアッセイのステップと、

先のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、サイトカイン B L y S の濃度の 1 つ以上の参照値とを比較するステップと（なお、この参照値は、健康な集団（健康な血液提供者：H B D）について、または免疫介在性疾患に罹患した、および/または特定の臨床的症状（例えば B 細胞のクローン性または T 細胞のクローン性）が見られるとの診断を受けた患者の集団について、あるいは治療法の開始前に分析した同じ患者からの血清サンプルについて決定された参照値である。）

先のステップから得られる、サイトカイン B L y S の決定された濃度と、先のステップにおいて示されたサイトカイン B L y S 濃度の参照値との間の、有意な偏差を特定するステップと、

上記ステップに従って、特定の臨床的症状（例えば B 細胞のクローン性または T 細胞のクローン性）について、または上述の免疫介在性疾患の過程における治療有効性のレベルについて診断および/または予測を行うための、決定的なおよび/または推定的な型のステップとである。

【 0 0 9 4 】

診断方法の特定の場合において、上述の比較のステップは、患者について決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、健康な集団について決定されたサイトカイン B L y S の濃度の 1 つ以上の参照値とを比較するために実施される。これにより、有意な偏差を特定するステップによって、上述の疾患の一つに罹患したとして患者を選択する。また、有意な偏差を特定するステップと、決定的なおよび/または推定的な型の最後のステップとの間で、患者について決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、別の患者の集団のサイトカイン B L y S の濃度の値とを比較する、さらに別の比較ステップを設ける。この“別の患者”とは、免疫介在性疾患に罹患した、および/または特定の臨床的症状が見られるとの診断を受けた患者である。そして、この別の比較ステップを設けることによって、最後のステップにおいて、前述の全ての免疫介在性疾患の中から、決定された免疫介在性疾患であると診断する。

【 0 0 9 5 】

好ましくは、アッセイは、異なる生物学的なマトリックス（血液、尿、脳脊髄液、空洞性浸出液（cavitary effusions）、組織切片、細胞培養物）における B l y S を特定および定量化することができる方法から選択される。

【 0 0 9 6 】

また、このアッセイは、E L I S A の技術を用いた、主要病院に通常備え付けられている自動装置を使用して実現されるので、このアッセイを採用しても、この新しいマーカを使うにあたって利用する病棟の設備またはこの病棟を構成する構造物に対して実質的な修正を加えるわけではない。

【 0 0 9 7 】

したがって、本発明は、B L y S のアッセイの使用を、以下の状況においても革新的な様式にて提供する：

i i) 臓器に特異的な自己免疫性疾患および輸血反応（例えば免疫不全症（I g A 欠乏症））が発生しやすい状態、他の全身的な自己免疫性疾患または臓器に特異的な自己免疫性疾患、H L A の遺伝子型、慢性のウイルス感染症が存在しやすい状態における診断用および/または予測用マーカ、

i i i) 第 i) 項で述べた、臓器に特異的な自己免疫性疾患（セリアック病の患者における食事療法の遵守、免疫系の活性化マーカ、治療法の一般的な有効性、疾患の再活動化

10

20

30

40

50

、罹患した組織の残存機能、萎縮の進行など)のモニタリング(なお、この場合、本発明に基づいて、上記モニタリング方法は上記診断方法と同じステップを包含し、治療を伴う、または治療を伴わない臨床経過観察の間に、自己免疫性疾患の患者に対して適用される。さらにこの場合、上記第3の段階において、上述の比較は、患者において前もって検出されたサイトカインB L y Sの濃度の1つ以上の値に対しても行われ、また、患者における免疫介在性疾患の進行を経時的に評価するために、第5の診断ステップに基づいて、その後の第6のステップにおいて、先行する5つのステップを所定の時間間隔で繰り返すことが決定されてもよい。)、

v) (例えばセリアック病の患者または自己免疫性甲状腺炎において)より侵襲的アプローチの前に行う、診断のプロセスにおけるさらなる”決定を行う物(decisional maker)”。

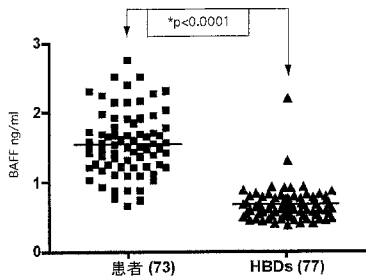
【0098】

上述したような免疫介在性疾患の過程における診断方法および予測方法における、サイトカインBリンパ球刺激因子の血清学的なアッセイの使用に対して、本発明の分野および範囲から逸脱することなく、各部および/またはステップの修正および/または付加を行ってもよいことは明らかである。また、本発明は特定の例を参照して記載されているが、当該技術分野の当業者が、診断方法および予測方法における、サイトカインBリンパ球刺激因子の血清学的なアッセイの使用の他の等価の形態を実現することができることも明らかであるが、これらの形態は全て請求項において説明する特性を有している限り、請求項において規定する保護の対象となるものである。

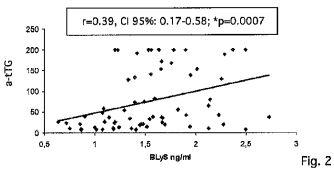
10

20

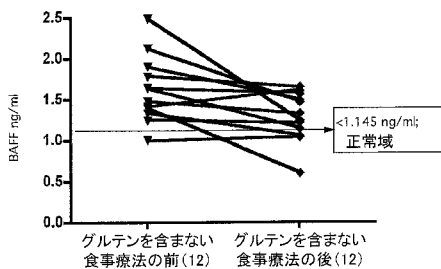
【図1】



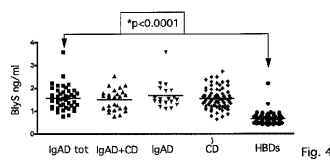
【図2】



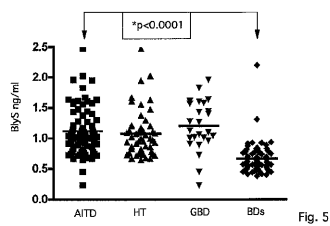
【図3】



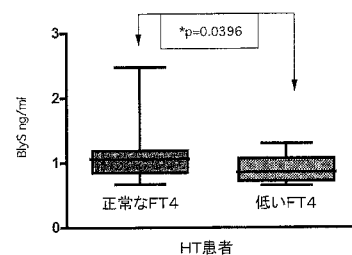
【図4】



【図5】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成22年6月1日(2010.6.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、輸血後の免疫処置および輸血後の反応の、臨床管理のための予測試験およびモニタリング試験としてのサイトカインBリンパ球刺激因子(B_LyS)の血清学的なアッセイの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

サイトカインBリンパ球刺激因子(B_LyS)は、“TNFファミリーのB細胞活性化因子(BAFF)”としても知られ、1999年に腫瘍壊死因子(TNF)のスーパーファミリーのメンバーとの相同性に基づいて発見され、その特性が知られるようになった(Scneider P.ら, J Exp Med. 1999;189(11): 1747~1756、およびNardelli B.ら, Blood. 2001; 97(1):198~204)。

【0003】

B_LySは、B細胞の発生および分化を調節する際に鍵となる因子の一つであると現在考えられているので、免疫応答において非常に重要な役割を果たす(Mackay F., Brownning JL. Nat Rev Immunol 2002;2:465~475、およびBatten Mら, J Exp Med 2000; 192(10): 1453~1466)。

【0004】

B_LySは、例えば、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞などの骨髄細胞株によって合成され、膜タンパク質として発現し、主として可溶性の形態で放出される(Huard B.ら, Int Immunol 2004;16:467~475、およびNardelli B.ら, Blood. 2001;97(1):198~204)。

【0005】

近年、このようなサイトカインを分泌することができる一連の細胞種はさらに増加し、非骨髄性細胞(例えば、髄様ストローマの細胞(Gorelik Lら, J Exp Med 2003;198:937~945)、滑膜細胞(Ohata J.ら, J Immunol 2005;174(2):864~870)、アストロサイト(Markus Krumbholzら, J Exp Med. 2005;201(2):195~200)、唾液腺上皮(Ittahl M, Miceli-Richard C., Eric Gottenburg Jら, Arthritis Res Ther. 2006;8(2):R51)、および腸上皮(Xu W., He B., Chiu A.ら, Nature Immunol 2007;8(3):294~303)など)も包含するようになった。

【0006】

B_LySは、3つの受容体との相互作用を介してその機能を発揮する。これらの3つの受容体の中でもっとも重要なものはBAFF受容体(BAFFR)であり、Bリンパ球によって独特の様式にて発現する(Ng LGら, J Immunol. 2004;173(2):807~817)。B_LySとBAFFRと結合によって、いくつかの抗アポトーシス因子(Bcl2、Bcl-xL、Mcl-1)の発現の増加が誘導される。これにより、成熟B細胞の生存および増殖が促進される(Craxton A.ら, J Exp Med. 2005; 202(10): 1363~1374)。

【0007】

B_LySは、APRIL(増殖を誘導するリガンド)と呼ばれるTNFスーパーファミリーの別のメンバーに対して高い相同性を有する(Hahne Mら, J Exp Med 1998;188:1185~1190)。このAPRILは、3つの受容体のうち2つの受容体、つまり、TACI(膜貫通型活性化因子およびカルシウム調整シクロフィリンリガンド(transmembrane activa

tor and calcium-modulating cyclophilin ligand)) および B C M A (B 細胞成熟抗原) を、 B L y S と共有している (Thompson JS, Schneider P, Kalled SLら, J Exp Med. 2002;192(1):129~135、および Seshasayee D, Valdez P, Yan Mら, Immunity 2003;18(2):279~288)。

【 0 0 0 8 】

B 細胞のホメオスタシスにおける B L y S の重要性は、マウスのモデルに関する研究によって明らかになった。

【 0 0 0 9 】

B L y S の発現が抑止された B L y S ノックアウトマウスでは、成熟 B リンパ球のプールの重大な変化が観察される (Gross JAら, Immunity 2001;15:289~302)。これに対して、B L y S を過剰発現するマウス (B L y S 遺伝子を導入されたマウス) は、自己免疫性疾患に典型的に見られる特徴を多数発生させる。

【 0 0 1 0 】

この特徴としては、脾肥大およびリンパアデノ肥大、高血清レベルの自己免疫性抗体 (リウマチ因子、抗 D N A)、シェーグレン症候群 (Sjogren ' s syndrome ; S S) の過程において見られるような、腺構造の破壊および分泌機能の損失をともなう耳下腺の B 細胞の浸潤、全身性エリテマトーデス (S L E) に典型的な糸球体腎炎を大いに想起させる腎臓の変化、および B 細胞の異常増殖が挙げられる (Mackay Fら, J Exp Med. 1999;190(11):1697~1710、および Thien Mら, Immunity 2004;20(6):785~798)。

【 0 0 1 1 】

このように、実験によって得られた証拠は、B L y S が生理的なレベルにおいて B 細胞の生存および分化を促進するが (Mackay F, Browning JL. Nat Rev Immunol 2002;2:465~475)、超生理的な濃度において通常は免疫系によって抑制される自己反応性 B リンパ球を生存および増殖させようであることを示している (Thien Mら, Immunity. 2004;20(6):785~798)。

【 0 0 1 2 】

この実験的証拠にしたがって、B L y S の高血清レベルおよび高組織レベルが、最近、いくつかの自己免疫性疾患および I g A 欠乏症において記録された。これらの自己免疫性疾患および I g A 欠乏症の全ては、アレルギー性反応および輸血反応の発生率が一般に増加することによって特徴付けられる (Ramsey Gら Transfusion 1995;35:582-6; Rogers R Lら, Am J Hematol. 1998 Apr;57(4):326~330)。

【 0 0 1 3 】

B L y S のレベルが増加する自己免疫性疾患としては、シェーグレン症候群 (S S)、関節リウマチ (R A)、全身性エリテマトーデス (S L E)、全身性硬化症 (S S c)、多発性硬化症 (M S)、混合型クリオグロブリン血症 (M C)、セリアック病 (C D)、自己免疫性甲状腺炎 (A I T)、およびウェゲナー肉芽腫症などが挙げられる (Stohl W. B Curr Rheumatol Rep 2002;4(4):345~350、Seyler TMら, J Clin Invest. 2005;115(11):3083~3092、Mariette Xら, Ann Rheum Dis. 2003;62(2):168~171、Matsushita Tら, Arthritis Rheum. 2006;54(1):192~201、M. Thangarajら, J Neuroimmunol 2004;152:183~190、Fabris Mら, J Rheumatol 2007;46:37~43、Fabris Mら Scan J Gastroenterol 2007;42(12):1434~1439、Fabris Mら, Autoimmun Rev. 2010 Jan;9(3):165~169および M. Krumbholzら, J Autoimmun 2005;25:298~302)。

【 0 0 1 4 】

一般に、これらの自己免疫性疾患において、B L y S の血清レベルおよび組織レベルは、患部組織 (骨膜、唾液腺) における疾患に特異的な自己抗体のレベル、ならびにリンパ球浸潤の存在およびレベルと相関関係にある。特に、異所性の胚中心の形成は、B L y S および A P R I L の存在と相関関係にあるようである (Jonsson MVら, J Clin Immunol 2005;25:189~201、および Szodoray Pら, Clin Immunol 2005;17:168~176)。

【 0 0 1 5 】

B L y S のレベルの上昇は、臓器拒絶反応の過程においても見られる。この場合、T -

リンパ球に対する B L y S と B A F F R との相互作用が、移植した臓器に対抗する T 細胞の活性化および増殖を促進する (Ye Q ら, Eur J Immunol 2004 ;34 :2750 ~ 2759)。M H C の不適合に起因する心臓移植の拒絶反応マウスのモデルにおいて、B L y S - B A F F R を遮断すると、移植した臓器の生存が大幅に延長される。

【 0 0 1 6 】

さらに、I g A 欠乏症 (I g A D) は、自己免疫性疾患および (輸血反応を包含する) アレルギー性反応と一般に関連付けられる。また、我々は、関連付けられた自己免疫性障害から独立して、I g A D に罹患した患者において B L y S のレベルが増加することも示した。この結果によって、このような異議 (contest) において、関連付けられた自己免疫性障害だけに限らず、B L y S の増加が、免疫処置および免疫介在性の輸血反応の素因となる因子を表わしているのではないかと、という仮定にたどり着いた。

【 0 0 1 7 】

免疫に関連した輸血反応としては、血漿または赤血球の不適合に起因し、輸血に伴って起こる可能性のある全ての合併症 (例えばスリルハイパーセルミックシンドローム (thri ll - hyperthermic syndrome)、アレルギー性反応など) が挙げられるが、特に、輸血後の溶血性反応が挙げられる。近年、自己免疫性疾患に罹患した患者は、一般的な集団と比較して、輸血後に不規則同種抗体の生成量を増加させることが観察された (Ramsey G ら Transfusion 1995;35:582 ~ 586)。不規則同種抗体とは、輸血、妊娠、または活動性免疫の獲得の後に、非自己赤血球抗原に対して生成されるか、あるいは、免疫グロブリンもしくは血漿の注入、または臓器もしくは骨髄の移植の後に受動的に獲得される抗体である。同種抗体の存在頻度は、一般的な集団において 0 . 3 % ~ 3 8 % の間でばらつきがあり、血液中の同種抗体の検出に使用される新しい方法の感度が増すことによって連続的に増加している。これらの同種抗体は、臨床上の相関性を有する溶血性輸血反応の大半にとっての原因である。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 8 】

【 非特許文献 1 】 Schneider P. ら, J Exp Med. 1999;189(11): 1747 ~ 1756

【 非特許文献 2 】 Nardelli B. ら, Blood. 2001;97(1):198 ~ 204

【 非特許文献 3 】 Mackay F., Browning JL. Nat Rev Immunol 2002;2:465 ~ 475

【 非特許文献 4 】 Batten M ら, J Exp Med 2000; 192(10): 1453 ~ 1466

【 非特許文献 5 】 Huard B. ら, Int Immunol 2004;16:467 ~ 475

【 非特許文献 6 】 Gorelik L ら, J Exp Med 2003;198:937 ~ 945

【 非特許文献 7 】 Ohata J. ら, J Immunol 2005;174(2):864 ~ 870

【 非特許文献 8 】 Markus Krumbholz ら, J Exp Med. 2005;201(2):195 ~ 200

【 非特許文献 9 】 Ittahltah M, Miceli-Richard C., Eric Gottenburg J ら, Arthritis Res Ther. 2006;8(2):R51

【 非特許文献 1 0 】 Xu W., He B., Chiu A. ら, Nature Immunol 2007;8(3):294 ~ 303

【 非特許文献 1 1 】 Ng LG ら, J Immunol. 2004;173(2):807 ~ 817

【 非特許文献 1 2 】 Craxton A, ら, J Exp Med. 2005; 202(10): 1363 ~ 1374

【 非特許文献 1 3 】 Hahne M ら, J Exp Med 1998;188:1185 ~ 1190

【 非特許文献 1 4 】 Thompson JS, Schneider P, Kalled SL ら, J Exp Med. 2002;192(1): 129 ~ 135

【 非特許文献 1 5 】 Seshasayee D, Valdez P, Yan M ら, Immunity 2003;18(2):279 ~ 288

【 非特許文献 1 6 】 Gross JA ら, Immunity 2001;15:289 ~ 302

【 非特許文献 1 7 】 Mackay F ら, J Exp Med. 1999;190(11):1697 ~ 1710

【 非特許文献 1 8 】 Thien M ら, Immunity 2004;20(6):785 ~ 798

【 非特許文献 1 9 】 Stohl W. B Curr Rheumatol Rep 2002;4(4):345 ~ 350

【 非特許文献 2 0 】 Seyler TM ら, J Clin Invest. 2005;115(11):3083 ~ 3092

【 非特許文献 2 1 】 Mariette X ら, Ann Rheum Dis. 2003;62(2):168 ~ 171

- 【非特許文献 2 2】Matsushita Tら, Arthritis Rheum. 2006;54(1):192 ~ 201
 【非特許文献 2 3】M. Thangarajら, J Neuroimmunol 2004;152:183 ~ 190
 【非特許文献 2 4】Fabris Mら, J Rheumatol 2007;46:37 ~ 43
 【非特許文献 2 5】M. Krumbholzら, J Autoimmun 2005;25:298 ~ 302
 【非特許文献 2 6】Jonsson MVら, J Clin Immunol 2005;25:189 ~ 201
 【非特許文献 2 7】Szodoray Pら, Clin Immunol 2005;17:168 ~ 176
 【非特許文献 2 8】Ye Qら, Eur J Immunol 2004 ;34 :2750 ~ 2759
 【非特許文献 2 9】Ramsey Gら Transfusion 1995;35:582-6
 【非特許文献 3 0】Rogers RLら, Am J Hematol. 1998 Apr;57(4):326 ~ 330
 【非特許文献 3 1】Fabris Mら Scan J Gastroenterol 2007;42(12):1434 ~ 1439
 【非特許文献 3 2】Fabris Mら, Autoimmun Rev. 2010 Jan;9(3):165 ~ 169
 【非特許文献 3 2】Ramsey Gら Transfusion 1995;35:582 ~ 586

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

このような背景から、本発明の目的の1つは、免疫処置および免疫関連輸血反応（輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応）の防止および臨床管理のための予測試験として、リスク評価のためのスクリーニング試験として、サイトカインBリンパ球刺激因子B L y Sの血清学的アッセイを使用することである。本発明は、輸血または再輸血の対象となる全ての患者、特に素因となる疾患を有する患者（例えば、自己免疫性疾患およびI g A Dに罹患した患者、ならびに、アレルギー性反応の病歴を有する患者）に対して適用してもよい。

【0020】

本発明は、免疫処置および輸血後の輸血反応の防止および管理において現在使用されている手法の限界を解消する。

【0021】

本発明のもう一つの目的は、B L y Sレベルを（例えば、コルチコステロイド、または調査中の抗B L y S剤（ベリムマブ（b e l i m u m a b）およびアタシセプト（a t a c i c e p t）など）を使用して）低減させる、または正常化する個別化された治療法が提案され得る患者を特定する方法として、サイトカインB L y Sのアッセイを使用して、現在使用されている手法の限界を解消することである。

【0022】

現在の技術の短所を解消し、上記目的およびその他の目的を達成して長所を実現するために、出願人は、本発明について研究し、試験を行い、そして本発明を具現化した。

【課題を解決するための手段】

【0023】

本発明を独立項において規定し、その特徴を記述する。一方で、従属項には、本発明の他の特徴、または主な発明的発想の変形例を記載する。

【0024】

B細胞の集団に関する証拠およびB L y Sの存在に関する証拠は、本明細書に記載される免疫に関連した輸血反応において、全く欠如していた。したがって、これまで、B L y Sが免疫に関連した輸液反応においても重要な病因としての役割を有するのかもしれないという仮説が立てられたことはない。

【0025】

この仮説は、I g A欠乏症および輸血反応における全身的なおよび臓器に特異的な自己免疫性疾患における知見および経験から得られる関連する科学的背景を、これらの障害におけるB L y Sに関する研究と総合することによって形成されている。このプロセスは、共同発明者らの異なる専門知識を体系的に統合することから得られた。

【0026】

輸血反応を示す、または輸液反応を示さない患者に関する予備的な研究から発明者らに

よって得られた結果は、共同発明者らが、i) 輸血後の免疫処置（すなわち、抗血液細胞抗体の生成）および（それ故）輸血反応の、リスクの評価および予測的管理のための新しい有用なマーカーとして、ベースラインおよび輸血後の経過観察における B L y S を見出すことにつながった。特に、ベースラインおよび輸血後の経過観察における B L y S の血清レベルは、免疫処置および（それ故）輸血反応のリスクおよび / または素因を示すマーカーとして、現れた。このため、免疫処置および輸血反応のリスクが高い患者を、血清 B L y S によって特定できる可能性があり、これらの患者において、輸血をさらに評価すべきである。そして、このような高いリスクが存在するのであれば、輸血は可能な限り避けるべきである。また、上述した予備的な研究から発明者らによって得られた結果は、共同発明者らが、i i) B L y S のレベルを（例えばコルチコステロイドまたは調査中の抗 B L y S 剤（ベリムマブおよびアタシセプトを使用して））低減させる、または正常化する個別化された治療が推薦され得る患者を、検出する方法として、ベースラインおよび輸血後の経過観察における、B L y S のアッセイを特定することにつながった。これによれば、B L y S の血清レベルのアッセイは、輸血に対する警告（第 i 項）に加えて、輸血を回避することができない場合、異なる治療手法の対象となる患者を特定する方法ともなり得る。

【 0 0 2 7 】

上述の目的に従って、本発明の1つの特徴は、輸血反応を示唆する症状または徴候を有する、またはこれらの症状または徴候を有しない、輸血の対象となるまたは輸血を受けた全ての患者、特に輸血反応（つまり自己免疫性疾患、免疫不全症）のリスクが高い患者において、サイトカイン B リンパ球刺激因子（B L y S）の血清学的なアッセイを、免疫処置のリスクが高く、したがって輸血に関連した免疫介在性疾患（例えば輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応など）を発症するリスクが高い患者を特定する方法としての、以下の方法における使用に関する。この方法は、

遠心分離によって血清が得られ得る血液サンプルを、この患者から、ベースライン（つまり、輸血前、ならびに輸血からおよそ1ヶ月後および4ヶ月後）において採取する第1のステップと、

市販のキットを典型的に使用することによって、この血清サンプルを（輸血前に、ならびに輸血からおよそ1ヶ月後および4ヶ月後に）検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第2のステップと、

第2の段階において決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、健康な集団について前もって得られたサイトカイン B L y S の濃度の参照値とを比較する第3のステップと、

第3のステップにおける比較から導き出される、第2の段階において決定されたサイトカイン B L y S の濃度と健康なコントロールの集団について前もって得られたサイトカイン B L y S の濃度の参照値との間の、有意な偏差を特定して、上述の疾患（輸液反応）を発症するリスクのある患者を選択する第4のステップと、

選択された患者の、第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、サイトカイン B L y S の濃度の1つ以上の参照値（なお、これらの参照値は、輸血に関連した免疫介在性疾患に罹患した一連の患者について前もって得られた B L y S のベンチマークの範囲内である。）とを比較する第5のステップと、

第5のステップにおいてなされた比較に基づいて、上述の免疫介在性疾患の1つ以上の確定的な疾患を発症するリスクが高いとみなす第6のステップと、
を包含する。

【 0 0 2 8 】

関連する病棟の設備またはこの病棟を構成する構造物に大幅な修正を加える必要がなく、通常大規模な病院の分析ラボに存在する型の免疫学的な酵素アッセイ（酵素結合免疫吸着測定法（エライザ））を実施可能な自動装置を、患者の血清中における B L y S の濃度を分析するために第2のステップにおいて使用することは、本発明の利点である。

【 0 0 2 9 】

本発明の別の革新的な特徴は、B L y S のレベルを（例えば、コルチコステロイドまた

は調査中の抗 B L y S 剤（ベリムマブおよびアタシセプトなど）を使用して）低減させる、または正常化する個別化された治療が提案され得る患者を特定するマーカーとしての、サイトカインの B リンパ球刺激因子（B L y S）の使用である。

【0030】

この目的を実現するために、(i) B L y S の血清レベルが正常域に包含される血清レベルを解消する場合、輸血反応の素因のマーカーとして、輸血後の B L y S の血清学的濃度のモニタリングを有利に使用することができるか、あるいは、(ii) 輸血 / 再輸血に対して警告するか、または輸血を受けている患者の治療的処置の有効性を制御する、以下のステップを包含する方法において、B L y S のアッセイをマーカーとして有利に使用することができる。すなわち、この方法は、

新しい治療法を行う前に、この患者から血液サンプルを採取して血清を得る第 1 のステップと、

この血清のサンプルを検査して、サイトカイン B l y S の濃度を決定する第 2 のステップと、

抗 B L y S 治療法の開始後または輸血後の所定の時間（例えば、輸血から 1 ヶ月および 4 ヶ月後）に患者から血液サンプルを採取する第 3 のステップと、

第 3 のステップにおいて採取された 1 つ以上の血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第 4 のステップと、

第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、第 4 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度とを比較する第 5 のステップと、

第 5 のステップにおける比較から導き出される、第 2 のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と第 4 のステップにおいて得られるサイトカイン B L y S の濃度の値との間の、有意な偏差を特定する第 6 のステップと、

免疫処置および輸血反応の防止のために、第 6 のステップにおいて特定された偏差に基づいて、免疫処置のリスクがあるとみなし、したがって、輸血反応を発症するリスクがあるとみなすか、または抗 B L y S 治療法の有効性を試験する第 7 のステップと、を包含する。

【0031】

本発明は、輸血を受けている患者の、診断手法および予測手法の改善、ならびに治療を目的としたモニタリングの改善を可能にする。

【0032】

本発明の変形例によれば、本発明に係る B L y S のアッセイの使用は、

患者を対象とする、輸血 / 再輸血の後の輸血反応としての免疫処置のための、可能性のあるさらなるリスクファクター、ならびに輸液反応の主な徴候および症状を、現在の最高の知見に基づいて特定するための、理学的および生化学的な検査、あるいは

患者から採取された末梢血液より抽出された DNA に関する（B L y S の発現に関連する遺伝的素因、または B L y S の発現に関連しない遺伝的素因の）分子的な分析の分析方法と組み合わせられ得る。

【0033】

上記およびその他の本発明の特徴は、実施形態の好適な態様についての以下の記載から明らかになる。ただし、これらの実施形態は、添付の図面を参照する非制限的な例として与えられている。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図 1】図 1 は、健康な血液提供者（H B D）に対して、セリアック病の患者（C D）における血清 B リンパ球刺激因子（B L y S）のレベルを比較するグラフである（正常域： $< 1.145 \text{ ng/ml}$ 、平均 + 2 S D）。

【図 2】図 2 は、セリアック病の患者における、サイトカイン B リンパ球刺激因子（B L y S）の濃度と抗体 a - t T G の濃度との間の、有意な相関を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、セリアック病の患者においてグルテンを含まない食事療法（gluten-free

e diet ; G F D) を実施した後の、Bリンパ球刺激因子 (B L y S) の濃度の有意な減少を示すグラフである ($1.619 \pm 0.410 \text{ ng/ml}$ から $1.283 \pm 0.310 \text{ ng/ml}$ へ減少 ; * $p = 0.0122$ 、ウィルコクソン符号順位検定)。

【図4】図4は、健康な血液提供者 (H B D) に対して、I g A D の患者において、全体 (I g A D t o t) の場合および2つのサブグループに分けた場合の、血清Bリンパ球刺激因子 (B L y S) のレベルを比較するグラフである。2つのサブグループとは、セリアック病に罹患したI g A D の患者 (I g A D + C D) と、C D に罹患していないI g A D の患者 (I g A D) とである (正常域 : $< 1.145 \text{ ng/ml}$ 、平均 + 2 S D)。

【図5】図5は、健康な血液提供者 (H B D) に対して、自己免疫性甲状腺炎 (A I T D) の患者において、全体的場合および橋本甲状腺炎 (H T) とグレーブス病 / バセドウ病 (G B D) とを区別した場合の、血清中の B L y S のレベルを比較するグラフである (正常域 : $< 1.145 \text{ ng/ml}$ 、平均 + 2 S D)。

【図6】図6は、F T 4 の正常なレベルまたは F T 4 の低いレベルを有する H T 患者において、血清中の B L y S のレベルを比較するグラフである。

【図7】図7は、輸血 (B T) の対象となる無作為に選んだ34人の患者、輸血後に免疫介在性の輸血反応を発症しなかった22人の患者 (N o B T R)、および輸血後に免疫処置または輸血反応を発症した21人の患者 (Y e s I M T R) における、B L y S の血清レベルを、77人の年齢および性別が一致する健康な血液提供者における B L y S の血清レベルと比較して示す図である。B L y S のレベルが非常に高い症例も見られたものの、全般的には、B T の対象となる患者における B L y S の血清レベルは、H B D における B L y S の血清レベルに重ねることができた ($0.78 \pm 1.01 \text{ ng/ml}$ 対 $0.66 \pm 0.24 \text{ ng/ml}$; $p = n s$)。B T を受けたが、I M T R を発症しなかった患者は、H B D よりも有意に高い B L y S のレベルを示した ($1.41 \pm 0.94 \text{ ng/ml}$; $p < 0.0001$)。一方、B T を受けて I M T R を発症した患者は、さらに高い B L y S のレベルを示した ($2.33 \pm 2.23 \text{ ng/ml}$; H B D に対して $p < 0.0001$ 、N o I M T R に対して $p = n s$)。マンホイットニーのノンパラメトリック t 検定を用いて統計的分析を行った。

【図8】図8は、輸血 (B T) 前および15.6 ± 8.5日後にアッセイを受けた患者のサブグループにおける、ベースラインおよび輸血後の B L y S の血清レベルを示す図である。全般的に、ベースラインのサンプルおよび輸血後のサンプルからは、B L y S の血清レベルに有意な増加が見られた ($0.64 \pm 0.40 \text{ ng/ml}$ 対 $1.32 \pm 0.69 \text{ ng/ml}$ 、 $p = 0.0098$ (ウィルコクソン符号順位検定による))。B T 後の時間が抗血液細胞抗体の発生を評価するほど十分ではなく、患者の誰もが T R を発症しなかったため、これらの患者の免疫処置について利用可能なデータはなかった。いずれにしても、一般的に B T 自体が B L y S の血清レベルの初期の有意な増加を決定するようである。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明は、サイトカインBリンパ球刺激因子 (B L y S) について当該技術分野において公知であることを基礎とし、免疫介在性輸血反応および輸血後の免疫処置を防止および管理するための、このようなサイトカインの血清学的なアッセイの革新的な使用を完成させる。

【0036】

特に、出願人が得た実験結果は、セリアック病、I g A 欠乏症、自己免疫性甲状腺炎、免疫介在性の輸液後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応などの状態における B L y S の発現および役割に関するものである。これらの状態は、特定の臓器の症状の原因となる免疫介在性応答 (輸血反応の任意の特定の臨床的な徴候および症状を伴うあるいは伴わない、同種抗体の生成 (つまり、免疫処置)) によって、自己抗体の分泌によって、これら疾患同士の高い相関性および他の自己免疫性疾患との高い相関性によって、およびB細胞のクローン性またはT細胞のクローン性が発現するリスクの増加によって特徴付けられている。また出願人が得た実験結果は、これらの病状における新しい診断用、予

測用、および治療用のマーカーとして B L y S を特定し提案することへと導いた。

【 0 0 3 7 】

さらに、輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応において得られた結果に基づいて、本発明は、将来 B L y S が特定される可能性のある、他の全ての免疫介在性の輸血反応にも拡張され得る。

【 0 0 3 8 】

関節リウマチ (R A)、シェーグレン症候群、混合型クリオグロブリン血症症候群 (M C)、自己免疫性甲状腺炎、セリアック病、および I g A 欠乏症における上述の B L y S に関して出願人が発表した研究結果によって、出願人は、サイトカイン B L y s が発見されて以降初めて、輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応における B L y S の発現の有望で重要な役割を調査することができるようになった。このように、免疫処置および輸血反応のリスクが増加することを特徴とする、自己免疫性疾患および免疫不全症における B L y S の過剰発現に関連して先に発表された研究や発見は、本発見の前提であった。

【 0 0 3 9 】

R A において、出願人は、R A 患者の約 2 0 % において B L y S の血清レベルが高いことが、先の研究において実証されていることを確認した。また、これらの B L y S のレベルが、C D 2 0 + の B 細胞の除去を実現するモノクローナル抗体 (リツキシマブ) を有する R A 患者の治療後に大幅に増加したことも確認した (Quartuccio L ら Rheumatism 2004 ; 56 (3) : 143 ~ 6 ; M. Fabris ら, Ann Rheum Dis 2009 ; 68 (Suppl 3) : 75) 。

【 0 0 4 0 】

出願人は、M C 症候群および C 型肝炎ウイルス (H C V) によるウイルス感染症において、H C V 感染症そのものが、B L y S の発現の増加を誘発し、素因を有する被験者のサブセットにおいて自己反応性 B 細胞の増殖を維持することに寄与し、クリオグロブリン血症症候群を発症しやすくできることを示した。クリオグロブリン血症症候群に罹患した患者の血清における B L y S の値が慢性の H C V 感染症だけに罹患した被験者よりも非常に高いので、この症候群の発生は、B L y S の発現がさらに増加することとタイミングが一致した (Fabris M ら, J Rheumatol 2007 ; 46 : 37 ~ 43) 。全般的には、抗 B L y S 治療法は、これらの新規データに基づいて、M C 症候群における選択肢として初めて現れた。

【 0 0 4 1 】

これらの前提において、出願人は、セリアック病および自己免疫性甲状腺炎においても、B L y S のレベルが増加すると仮定した。

【 0 0 4 2 】

この効果は、主に内因性の (endogen) 抗ウイルス応答によって、つまりインターフェロンによって媒介される。なお、インターフェロンは、種々の研究によってインビトロにおいて B L y S の発現を強力に誘発することが示されている。

【 0 0 4 3 】

セリアック病の病因における、B リンパ球の役割は、H L A および T リンパ球の活性化が果たす根本的な役割と比較すると、これまでは非常に小さいと考えられてきた (LM Sol lid, Thorsby E. Gastroenterology 1993 ; 105 : 910 ~ 922, Spurkland A ら, Tissue anti gens 1997 ; 49 : 29 ~ 34, および Molberg ら, Gastroenterology 2003 ; 125 : 337 ~ 344) 。しかし、出願人は、セリアック病に罹患した患者において高い割合 (> 8 0 %) で、B L y S が高血清レベルにて見出される事を示した (図 1) 。

【 0 0 4 4 】

特に、図 1 は、セリアック病の患者における B L y S の血清レベルを、健康なコントロール (H B D とともに表記され、年齢および性別において調査対象の患者に匹敵する健康な被験者、つまり血液提供者からなるコントロール) と比較して示している。B L y S の血清レベルは、健康なコントロールと比べて、セリアック病の患者において非常に高い (マンホイットニーの t 検定、* p < 0 . 0 0 0 1) (正常域 : < 1 . 1 4 5 n g / m l 、平均 + 2 S D) 。

【0045】

ここで初めて明らかにされるこの結果は、この広く見られる（集団の約1.1%）腸疾患の病因の解釈における新しい鍵を暗示している。特に重要であることは、B L y Sがこれまで研究されてきた自己免疫性障害の全てと比べても、B L y Sの上方制御は、セリアック病において最も広く記録されている（5人中4人の患者）ことである。さらに、出願人が測定および分析したB L y Sの血清レベルは、この疾患に特異的な抗体である抗トランスグルタミナーゼ（a - t T G）の血清レベルと有意な相関があることを示している（図2参照。同図はB L y Sの血清レベルとa - t T G I g Aレベルとの相関関係を示している。スピアマンの順位試験： $r = 0.399$ 、95% C I： $0.1724 \sim 0.5856$ 、 $p = 0.0007$ ）。また、B L y Sとa - t T Gとの両方が、グルテンを含まない食事療法の導入および疾患の臨床上の寛解と同時に減少している（図3を参照。同図は、グルテンを含まない食事療法の開始後の、B L y Sの血清レベルの制御を示している）。12人中8人（75%）の患者において、食事療法後のB L y Sのレベルが依然正常域より高いものを用いたアッセイ）、食事療法後のB L y Sのレベルには、一般に有意な減少が見られる（ $1.619 \pm 0.410 \text{ ng/ml}$ から $1.283 \pm 0.310 \text{ ng/ml}$ へ減少；* $p = 0.0122$ 、ウィルコクソン符号順位検定）（ $> 1.145 \text{ ng/ml}$ 、エサイザのキット（R&D Systems社のクアントカインE L I S Aキット（Quantki ne ELISA kit）、Minneapolis, 55413 USA））。

【0046】

ただし、a - t T Gが陰性になり臨床上寛解に到達する症例であっても、B L y Sのレベルは大幅に減少したものの、正常域には達していない。このことは、疾患が無症候状態のまま継続すること、または疾患の素因になり、広く共有され、H L Aの遺伝子型に相当するB L y Sの基礎レベルが比較的高いことを示唆している。

【0047】

感染力を有する共同参加物（co-participation）（ロタウイルス）がセリアック病の病因において関与している可能性を示す最近の根拠からは、クリオグロブリン血症症候群において観察されたことと同じように、B L y Sの血清レベルの上昇について別の仮説が立てられる。

【0048】

したがって、B L y Sのアッセイは、非典型的な症状のある場合、陰性のa - t T Gの血清レベルをともなった場合、あるいは腸生検が実施不可能、または倫理的に薦められない場合などの疑わしい場合や、前記のような上記疾患に罹患するリスクが比較的高い個体の集団におけるスクリーニングとしても、さらなる診断上のツールとなる。

【0049】

さらに、高いB L y Sの血清レベルが全身的に継続すると、遺伝的に素因を有する個体において、他の自己免疫性疾患に対する罹患を促進する可能性がある。これは、B L y Sが、初期のトリガーおよびクローンの集団の形成から逃れるまで、その強力な抗アポトーシス効果によって、膨張したB細胞において遺伝子の変異をさらに促進することと同様である。

【0050】

出願人が前もって分析した混合型クリオグロブリン血症症候群の66人の患者において、高いレベルのB L y Sと有意な相関性を示した臨床上の特徴は、クローナルB細胞の増殖の存在だけであった。B細胞のクローン性の患者は、B細胞のクローン性を有しない患者と比較すると、非常に高いB L y Sのレベルを示した被験者の割合が有意に高かった（9.8%に対して33.3%；OR = 4.6、CI = 1.12 ~ 18.96、 $p = 0.04$ ）。

【0051】

これらの症例では、各種B細胞腫瘍（ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病）、およびさらに最近では一次的SS（primary SS）の患者の唾液腺に浸潤するBリンパ球（C Daridonら、Arthritis Rheum 2007；56:1134 ~ 11

44) において見られるように、B細胞のクローンも自己分泌刺激メカニズムによって、B L y Sを分泌し、疾患に寄与するのかもしれないと考えることもできる。

【0052】

B L y Sは、クリオグロブリン血症およびSSの過程、ならびに複数の腫瘍性障害において先に示したように、多段階プロセスにおいて重要な役割を果たし得る。このプロセスは、セリアック病においてもリンパ腫の形成を引き起こす。実際に、このプロセスはB細胞およびT細胞の両方を刺激する(Mackay F, Leung H. *Semin Immunol.* 2006;18(5):284-289)。びまん性大細胞型B細胞腸リンパ腫を伴うセリアック病の患者において、出願人が非常に高いレベル(8.5 ng/ml)のB L y Sを発見したことは、この仮説と矛盾しない。

【0053】

したがって、この結果は、B L y Sのアッセイを、B/T細胞のクローン性が疑われる(グルテンを含まない食事療法を厳格に遵守しているにもかかわらず、高いa-tTGレベルが継続している)セリアック病の患者の症例の補助的診断法として使用することが可能であることを示唆している。

【0054】

選択的な原発性I g A欠乏症(I g A D)は、免疫不全症のもっともよく見られる型であり、白人における推定発生率は1:600である。I g A単独欠損症の個体は、正常なI g A遺伝子を有するが、リンパ球の最終分化に欠陥を有しており、このことが血清およびムコサルI g Aの生成不足を引き起こす(Cunningham-Rundles C. *J Clin Immunol* 2001;21(5):303~309)。I g A Dに関連して多数の疾患、例えば、アレルギー、胃腸管および再発上気道の疾患、特に、自己免疫性疾患が報告されている(Liblau RSら, *Int Arch Allergy Immunol* 1992;99(1):16~27)。最もよく見られる相関はセリアック病(CD)との相関であり、CDは通常、I g A D患者において明らかに欠如している、特定のI g A抗体を検出することによって診断されるので、特に重要である。図4に示すように、出願人は、コントロール(0.66±0.24 ng/ml; p<0.0001)よりもI g A D患者(1.57±0.51 ng/ml)においてB L y Sの血清レベルが有意に高いことを見出した。特に、I g A D患者の77.8%(35人/45人)が、正常域を超えたB L y Sのレベル(>1.14 ng/ml)を有している。分析対象のI g A D患者のうち、26人がセリアック病CDに罹患していたが、I g A Dおよびセリアック病CDの患者19人と比べて大きな違いがなかった(1.67±0.57 ng/ml、p=nsに対して1.49±0.46 ng/ml)。I g A D患者と、CDに罹患しているが、I g Aが正常である上述した一連の患者との間では、B L y Sのレベルの差は見られなかった(1.54±0.46 ng/ml)。したがって、B L y Sは、I g A Dの患者において上方制御され、I g A Dと自己免疫性疾患とを強く関連付ける因子の一つである可能性があるが、B細胞のクローン性を形成するリスクを増加させる因子の一つである可能性もある。本発明では、B L y Sのアッセイを、I g A Dに罹患した被験者におけるB細胞のクローン性の形成の予測用マーカーとして革新的に使用する。

【0055】

自己免疫性の甲状腺疾患(AITD)は、よく見られる自己免疫性疾患であり、一般人口の罹患率は5%に上る。また、女性のほうが男性よりも罹患率が高い。甲状腺に指向する自己免疫(thyroid-directed autoimmunity)は、橋本甲状腺炎(HT)およびグレーブス・バセドウ病(GBD)の、2つの古典的自己免疫性症状において現れる。前者は、甲状腺機能低下症(抗TPOおよび抗サイログロブリン)の原因となり、後者は甲状腺機能亢進症(TSH受容体のアゴニストの自己抗体)の原因となる。AITDは、他の自己免疫性疾患(セリアック病、1型糖尿病、全身のコネクティブアイティス(systemic connectivitis))と関連することが多い。AITDは、おそらく共通の自己免疫を誘発する表現型を共有しているのであろう。他の自己免疫性疾患のように、AITDは、B細胞クローナル疾患(特にHT患者)の発生リスクを増加させる。

【0056】

図5に示すように、出願人は、77人の白人のA I T D患者（内訳、男性10人および女性67人、平均年齢 48.2 ± 16.1 歳、H T患者52人およびG B D患者25人）を研究し、B L y Sの血清レベルを、77人の年齢および性別が一致する健康なコントロールと比較して分析した。A I T D患者は、B L y Sのレベルにおいて有意な増加を示した（ $p < 0.0001$ ）。G B D患者は、H T患者よりも高いB L y Sを示す傾向があった（ $p = 0.06$ ）。H TおよびG Dのどちらにおいても、B L y Sのレベルと自己抗体との間の有意な相関性は見られなかった。一方で、B L y SとF T 4の間では、正の相関性が見られた（ $r = 0.31$ ； $p = 0.012$ ）。さらにその一方で、T S H（ $r = -0.45$ ； $p = 0.0002$ ）の場合は、逆の相関性が見られた。

【0057】

実際、H T患者において、F T 4のレベルが正常である患者は、甲状腺機能低下症患者に比べてB L y Sが非常に高い（* $p = 0.0396$ ）（図6）。

【0058】

出願人は、B L y SのレベルがA I T Dの患者において高いことを本発明において初めて仮定し、かつ見出した。このことは、これらの自己免疫性障害においても、B L y Sが病因としての重要な役割をしていることを示唆している。全身的自己免疫性疾患（R A、S S、L E S）において先行する実証より革新的な様式において、B L y Sのレベルは、甲状腺の機能性とは相関性を有するが、自己抗体の分泌とは相関性を有していない。したがって、B L y Sは、H Tの甲状腺機能が正常な第1の段階において比較的高く、甲状腺活性化のマーカーとして（自己抗体を分泌するプラズマ細胞のマーカーとしてではない）G B Dにおける甲状腺機能亢進症のレベルと相関性を有する。甲状腺がその機能を喪失すると（临床上は甲状腺機能低下症によって顕在化する）、B L y Sは減少する。また、B L y Sの過剰発現は、他の自己免疫性疾患またはリンパ増殖性疾患を発症するA I T Dの患者の割合の増加を説明する可能性のある、メカニズムの一つを表わしているのかもしれない。

【0059】

以上のように、本発明は、A I T Dの患者における治療の有効性の診断、予測、およびスクリーニングのためのB L y Sの血清学的なアッセイの使用を提案する。

【0060】

自己免疫性疾患の患者は、一般的な集団に比べて、輸血後に不規則同種抗体を生成する傾向が高いことが、最近観察されている。輸血反応の発生を予測できる公知のマーカーは、今のところ存在しない。自己免疫性疾患と免疫介在性のメカニズムとの関連に基づいて、出願人は、サイトカインB L y Sも輸血反応において役割を有する可能性があることを考えるに至った。この目的のために、ウディネ大学病院、血液製剤配布実験室の5人の患者に対して予備研究を行った。これらの5人の患者の内訳は、輸血を繰り返し行ったにもかかわらず同種抗体/自己抗体の形成を示さない患者（p t s A型）が2人と、高濃度の赤血球を複数単位にて輸血した後に同種抗体/自己抗体を形成した患者が3人（p t s B型）である。同種抗体/自己抗体反応のある患者（B型）では、反応のない患者（A型）に比べて、B L y S / B A F Fのレベルが高い傾向があった（平均値で、 1.29 ng/ml に対して 2.48 ng/ml ）。また、全てのB型の患者が、正常な閾値より高いB L y Sのレベルを示した（ $> 1.14 \text{ ng/ml}$ ）。

【0061】

出願人は、シェーグレン症候群において（そのうち5～10%の症例ではM C症候群を同時に示す）、耳下腺上皮細胞によっても生成され、B細胞の増殖、およびリツキシマブを用いた抗B細胞療法に対する耐性の原因となり得る、血清および組織のB L y Sの高いレベルを実証した（Quartuccio L R Open Rheumatol J 2008;2:38～43）。

【0062】

出願人はさらに、セリアック病および自己免疫性甲状腺炎において、B L y Sのレベルが大幅に増加することを、医学文献において初めて示した（Fabris M R Scan J Gastroenterol 2007;42(12):1434～1439; Fabris M R, Autoimmun Rev. 2010 Jan;9(3):165～169

)。セリアック病および自己免疫性甲状腺炎も、免疫処置および輸血反応のリスクの増加を特徴とするさらなる自己免疫性疾患である。最後に、出願人は、I g A Dにおいて血清 B L y S レベルが大幅に増加をすることも発見した (Fabris Mら Ann N Y Acad Sci. 2009 Sep;1173:268~273)。この血清 B L y S レベルの大幅な増加は、自己免疫および輸血反応と強く結びついている (Rogers RLら Am J Hematol. 1998 Apr;57(4):326~330)。自己免疫性疾患の患者は、一般的な集団に比べて、輸血後に不規則な同種抗体を生成する傾向が高いことが最近観察されている (Ramsey Gら Transfusion 1995;35:582~586)。

【0063】

輸血反応の発症を予測できる公知のマーカーは、今のところ存在しない。自己免疫性疾患における輸血反応の頻度の増加、および大半の輸血反応の免疫介在性メカニズムに基づいて、出願人は、サイトカイン B L y S が輸血反応においても役割を有する可能性があることを考えるにいたった。

【0064】

この目的のために、ウディネ大学病院、血液製剤配布実験室の5人の患者に対して予備研究を行った。これらの5人の患者の内訳は、輸血を繰り返し行ったにもかかわらず同種抗体/自己抗体の形成を示さない患者 (p t s A型) が2人と、高濃度の赤血球を複数単位にて輸血した後に同種抗体/自己抗体を形成した患者が3人 (p t s B型) である。同種抗体/自己抗体反応のある患者 (B型) では、反応のない患者 (A型) に比べて、B L y S / B A F F のレベルが高い傾向があった (平均値で、 1.29 ng/ml に対して 2.48 ng/ml)。また、全てのB型の患者が、正常な閾値より高い B L y S のレベルを示した ($> 1.14 \text{ ng/ml}$)。

【0065】

これらの予備的な結果に基づいて、出願人はさらに、研究を拡大し (図7)、B L y S の血清レベルを、輸血 (B T) の対象であるが、輸血されない34人の無作為に選択された患者、輸血の後に免疫処置も輸血反応も発症しない22人の患者 (N o B T R)、および輸血の後に同種抗体のために輸血反応 (2人) または免疫処置 (19人) を発症する21人の患者において分析した (Y e s I M T R)。データを、77人の年齢および性別が一致する健康な血液提供者について予め公表された一連のデータと常に比較した。全般的には、B T の対象となる患者における B L y S の血清レベルは、H B D における B L y S の血清レベルに重ねることができた ($0.78 \pm 1.01 \text{ ng/ml}$ 対 $0.66 \pm 0.24 \text{ ng/ml}$; $p = n s$)。B T を受けたが、I M T R を発症しなかった患者は、H B D よりも有意に高い B L y S のレベルを示した ($1.41 \pm 0.94 \text{ ng/ml}$; $p < 0.0001$)。一方、B T を受けて I M T R を発症した患者は、さらに高い B L y S のレベルを示した ($2.33 \pm 2.23 \text{ ng/ml}$; H B D に対して $p < 0.0001$ 、n o I M T R に対して $p = n s$)。注目すべきは、B L y S のレベルが最も高い患者は、2つの異なる血液バッグに対して2つの激しい輸血反応を起こしたことである。I M T R の患者の間において、B L y S の血清レベルが正常域の範囲を上回った ($> 1.14 \text{ ng/ml}$) 患者は、21人中15人 (71.4%) であった。これに対して、I M B T ではない患者の間において、B L y S の血清レベルが正常域の範囲を上回った患者は、22人中12人 (54.5%) であった (O R = 2、 $p = n s$)。

【0066】

平均値の比較のためにマンホイットニーのノンパラメトリック t 検定を用い、分割表のためにフィッシャーの正確確立検定を用いて統計的分析を行った。

【0067】

次いで、我々は、輸血前および輸血後の 15.6 ± 8.5 日において、対応する患者から繰り返し採取されたサンプルにおける血清中の B L y S の定量化を行った。そして、B T 自体が、B L y S の血清レベルの有意な増加 ($0.64 \pm 0.40 \text{ ng/ml}$ 対 $1.32 \pm 0.69 \text{ ng/ml}$ 、 $p = 0.0098$ (ウィルコクソン符号順位検定による)) を頻繁に (77%) 決定し、輸血後の1ヶ月以内に試験が繰り返された場合、B L y S の血清レベルの有意な増加を常に決定する (2人の患者のみが B L y S のレベルが変化したが

ったことを示したが、これらの2人の患者は血液サンプルが輸血後の1ヶ月よりも後に回収された唯一の患者である。)ことを確認した。

【0068】

このように、結果は、BTが、B L y Sの血清レベルの増加と関連していることを示している。そして、このような増加は、輸血後に免疫処置(明らかな輸血反応に進行するより高いリスクのある状態)、または免疫介在性輸血反応(血液細胞に対する抗体、ならびに輸血反応の臨床的徴候および臨床的症状)を発症する患者においてより高いように考えられた。

【0069】

したがって、本発明は、以下の状況において、血清B L y Sのアッセイを革新的な様式にて提供する。i)免疫処置および輸血後の輸血反応(輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、輸血反応)のリスクのある状況、ならびに輸血が、その兆候のために再評価されるべきである場合か、あるいは輸血の前および/または後の専用の治療が望ましいものである場合、免疫処置および輸血反応のリスクがより高い患者を選択する状況。

【0070】

自己免疫性疾患、または免疫不全症(I g A欠乏症および分類不能型免疫不全症など)に罹患した患者は、これらの状況において増加したB L y Sの発現についての発表されたデータ(出願人によって発表された最近のデータが挙げられる)に基づいて、リスクがさらに高いサブセットとして特定される。

【0071】

したがって、患者の免疫介在性の輸血反応における予測および/または効果的な治療法のスクリーニングに対して適用される本発明は、以下のステップを包含する。すなわち、患者の血清を得るための血液サンプルを採取するステップと、

この血清サンプルを検査して、濃度を決定するステップ、すなわちエサイザの技術を用いたサイトカインB L y Sのアッセイのステップと、

先のステップにおいて決定されたサイトカインB L y Sの濃度と、サイトカインB L y Sの濃度の1つ以上の参照値とを比較するステップと(なお、この参照値は、健康な集団(健康な血液提供者: H B D)について、または免疫介在性の輸血反応に罹患したとの診断を受けた患者の集団について、あるいは抗B L y S治療法の開始前または輸血前に分析した同じ患者からの血清サンプルについて決定された参照値である。)、

先のステップから得られる、サイトカインB L y Sの決定された濃度と、先のステップにおいて示されたサイトカインB L y S濃度の参照値との間の、有意な偏差を特定するステップと、

上記ステップに従って、特定の臨床的症状(同種抗体の生成、輸血反応)について、または上述の免疫介在性疾患の過程における治療有効性のレベルについて診断および/または予測を行うための、決定的なおよび/または推定的な型のステップとである。

【0072】

診断方法の特定の場合において、上述の比較のステップは、患者について決定されたサイトカインB L y Sの濃度と、健康な集団について決定されたサイトカインB L y Sの濃度の1つ以上の参照値とを比較するために実施される。これにより、有意な偏差を特定するステップによって、上述の病理学的な状態の一つに罹患したとして患者を選択する。また、有意な偏差を特定するステップと、決定的なおよび/または推定的な型の最後のステップとの間で、患者について決定されたサイトカインB L y Sの濃度と、別の患者の集団のサイトカインB L y Sの濃度の値とを比較する、さらに別の比較ステップを設ける。この“別の患者”とは、免疫介在性疾患に罹患した、および/または特定の臨床的症状が見られるとの診断を受けた患者である。そして、この別の比較ステップを設けることによって、最後のステップにおいて、前述の全ての免疫介在性疾患の中から、決定された免疫介在性疾患のリスクがあるとみなす。

【0073】

また、このアッセイは、E L I S Aの技術を用いた、主要病院に通常備え付けられてい

る自動装置を使用して実現されるので、このアッセイを採用しても、この新しいマーカーを使うにあたって利用する病棟の設備またはこの病棟を構成する構造物に対して実質的な修正を加えるわけではない。

【0074】

したがって、本発明は、B L y Sのアッセイの使用を、以下の状況においても革新的な様式にて提供する：

i i) 一般的な集団における輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、および輸血反応のための予測用マーカー、

i i i) 免疫処置および輸血反応の素因のある状態（自己免疫性疾患および免疫不全症（I g A 欠乏症および分類不能型免疫不全症）など）における輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、および輸血反応のための予測用マーカー、

i v) 輸血を受けている患者（免疫系の活性化マーカー、輸血反応の防止、治療法の有効性など）のモニタリング（なお、これらの場合、本発明に基づいて、上記モニタリング方法は上記診断方法と同じステップを包含し、治療を伴う、または治療を伴わない臨床上の経過観察の間に、自己免疫性疾患の患者に対して適用される。さらにこの場合、上記第3の段階において、上述の比較は、患者において前もって検出されたサイトカインB L y Sの濃度の1つ以上の値に対しても行われ、また、患者における免疫介在性疾患の進行を経時的に評価するために、第5の診断ステップに基づいて、その後の第6のステップにおいて、先行する5つのステップを所定の時間間隔で繰り返すことが決定されてもよい。）、
v) 上記i)、i i)、i i i)、i v) に包含される患者の管理におけるさらなる ” 決定を行う物（decisional maker）”。

【0075】

上述したような免疫介在性疾患の過程における診断方法および予測方法における、サイトカインBリンパ球刺激因子の血清学的なアッセイの使用に対して、本発明の分野および範囲から逸脱することなく、各部および/またはステップの修正および/または付加を行ってもよいことは明らかである。また、本発明は特定の例を参照して記載されているが、当該技術分野の当業者が、診断方法および予測方法における、サイトカインBリンパ球刺激因子の血清学的なアッセイの使用の他の等価の形態を実現することができることも明らかであるが、これらの形態は全て請求項において説明する特性を有している限り、請求項において規定する保護の対象となるものである。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者における免疫介在性疾患のリスクについての診断用マーカーとしてのサイトカインBリンパ球刺激因子（B L y S）のアッセイの使用であって、

該免疫介在性疾患は、輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、および輸血反応などの、輸血に関連した免疫介在性疾患を含む群に包含され、

該患者は、輸血反応を示唆する症状または徴候を有する、またはこれらの症状または徴候を有しない、輸血の対象となるまたは輸血を受けた全ての患者、特に輸血反応（つまり自己免疫性疾患、免疫不全症）のリスクが高い患者であり、

該患者から血液サンプルを採取する第1のステップと、

該血液サンプルを検査して、サイトカインB L y Sの濃度を決定する第2のステップと、

第2のステップにおいて決定されたサイトカインB L y Sの濃度を、健康なコントロール群について前もって得られたサイトカインB L y Sの濃度の1つ以上の参照値と比較する第3のステップと、

第3のステップにおける比較から導き出される、第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と該健康なコントロール群について前もって得られたサイトカイン B L y S の濃度の参照値との間の、有意な偏差を特定して、該免疫介在性疾患の一つに罹患したとして患者を選択する第4のステップと、

該免疫介在性疾患の一つに罹患したとして選択された患者の、第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、サイトカイン B L y S の濃度の1つ以上の参照値であって、該免疫介在性疾患に罹患した、および/または活動性疾患またはその特定の過程の診断が確立された、一連の患者について前もって得られた B L y S の参照値の範囲内である参照値とを比較する第5のステップと、

第5のステップにおいてなされた比較に基づいて、該免疫介在性疾患の1つ以上の確定的な疾患を発症するリスクが高いとみなす第6のステップと、
を包含する方法における、使用。

【請求項2】

前記方法の前記第2のステップが、E L I S Aの技術に基づく自動装置を用いて実施されることを特徴とする請求項1に記載の使用。

【請求項3】

免疫介在性疾患の予測をするための方法における予測用マーカーとしてのサイトカイン B リンパ球刺激因子 (B l y S) の使用であって、

該免疫介在性疾患は、輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、および輸血反応などの、輸血に起因する免疫介在性疾患を包む群に包含され、

該方法は、輸血の必要性のある患者を選択する予備的なステップと、

選択された患者から血液サンプルを採取する第1のステップと、

該血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第2のステップと

、
第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、サイトカイン B L y S の濃度の1つ以上の参照値とを比較する第3のステップと、

第3のステップにおける比較から導き出される、第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と第3のステップにおいて考慮される参照値との間の、有意な偏差を特定する第4のステップと、

該免疫介在性疾患について第4のステップにおいて特定された偏差に基づいて、予測を行う第5のステップと
を包含する、使用。

【請求項4】

免疫介在性疾患に罹患した患者の治療をモニタリングする方法におけるマーカーとしてのサイトカイン B L y S のアッセイの使用であって、

該免疫介在性疾患は、輸血後の免疫処置、母体と胎児との間の不適合、および輸血反応などの、輸血に起因する免疫介在性疾患を含む群に包含され、

該方法は、

該免疫介在性疾患を治療する治療ステップと、

輸血の前に、該患者から血液サンプルを採取する第1のステップと、

該血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第2のステップと

、
輸血の後および/または専用の抗 B L y S 治療法の開始後に、所定の時間間隔で該患者から1つ以上の血液サンプルを採取する第3のステップと、

第3のステップの該1つ以上の血液サンプルを検査して、サイトカイン B L y S の濃度を決定する第4のステップと、

第2のステップにおいて決定されたサイトカイン B L y S の濃度と、第4のステップにおいて患者から検出されたサイトカイン B L y S の濃度の値とを比較する第5のステップと、

第5のステップにおける比較から導き出される、第2のステップにおいて決定されたサ

イトカイン B L y S の濃度と第 4 のステップにおいて検出された B L y S の値との間の、
有意な偏差を特定する第 6 のステップと、

第 6 のステップにおいて特定された偏差に基づいて、輸血反応のリスクがあるとみなす
、および / または治療的処置に有効性があるとみなす第 7 のステップと、
を包含する、使用。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用であって、前記サイトカイン B L y S のアッ
セイが、

患者を対象とする、輸血反応の主な徴候および症状 (同種抗体、臨床的症狀) を特定可
能な理学的および生物化学的な検査、および

前記患者から採取された末梢血液より抽出された DNA に関する (B L y S の発現に関
連する遺伝的素因、または B L y S の発現に関連しない遺伝的素因の) 分子的な分析
からなる群より選択される、1 回または複数回の検査のステップと組み合わせられ得る、
使用。

【手続補正 3】

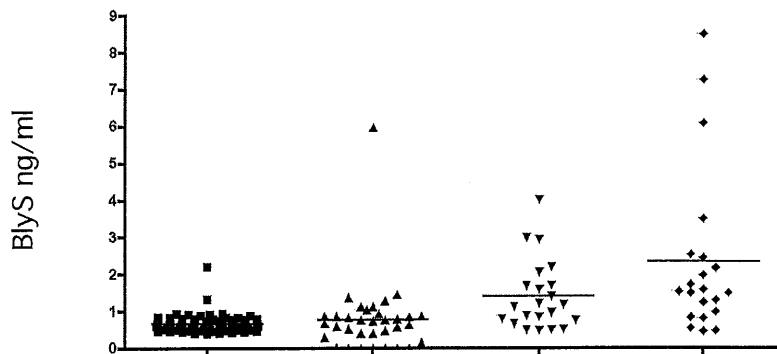
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 7

【補正方法】追加

【補正の内容】

【図 7】



【手続補正 4】

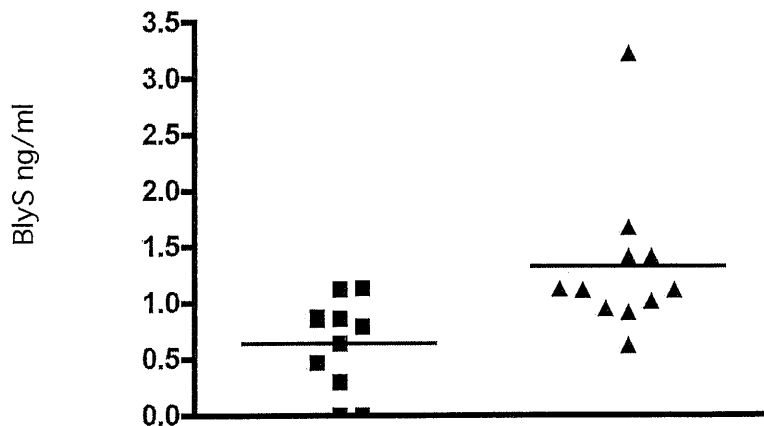
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 8

【補正方法】追加

【補正の内容】

【図 8】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/063081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/564 G01N33/68		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FABRIS M ET AL: "Elevated B cell-activating factor of the tumour necrosis factor family in coeliac disease" SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, XX, XX, vol. 42, no. 12, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 1434-1439, XP009109670 ISSN: 0036-5521 the whole document first published online on 29 August 2007, see http://www.informaworld.com/smpp/content?id=b=a11?content=10.1080/00365520701452225 -/-	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 April 2009	Date of mailing of the international search report 16/04/2009	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6618 Palenlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 840-2040 Fax: (+31-70) 840-8016	Authorized officer Thumb, Werner	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/063081

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIGITA ET AL: "Elevated serum BAFF levels in patients with autoimmune hepatitis" HUMAN IMMUNOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 68, no. 7, 19 June 2007 (2007-06-19), pages 586-591, XP022119640 ISSN: 0198-8859 abstract	1-6
X	MATSUSHITA TAKASHI ET AL: "Elevated serum BAFF levels in patients with localized scleroderma in contrast to other organ-specific autoimmune diseases." EXPERIMENTAL DERMATOLOGY FEB 2007, vol. 16, no. 2, February 2007 (2007-02), pages 87-93, XP002507467 ISSN: 0906-6705 abstract	1-6
A	WO 2004/074511 A (GARVAN INST MED RES [AU]; MACKAY FABIENNE [AU]; MACKAY CHARLES [AU]; B) 2 September 2004 (2004-09-02) cited in the application the whole document in particular example 1	1-6
A	CATALDO FRANCESCO ET AL: "Plasma cytokine profiles in patients with celiac disease and selective IgA deficiency." PEDIATRIC ALLERGY AND IMMUNOLOGY : OFFICIAL PUBLICATION OF THE EUROPEAN SOCIETY OF PEDIATRIC ALLERGY AND IMMUNOLOGY AUG 2003, vol. 14, no. 4, August 2003 (2003-08), pages 320-324, XP002507468 ISSN: 0905-6157 abstract	1-6
A	FORSBERG GOTE ET AL: "Concomitant increase of IL-10 and pro-inflammatory cytokines in intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease" INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 19, no. 8, August 2007 (2007-08), pages 993-1001, XP002507469 ISSN: 0953-8178 abstract	1-6
A	WO 2007/056288 A (BIOGEN IDEC INC [US]; HSU YEN-MING [US]; KALLED SUSAN L [US]) 18 May 2007 (2007-05-18) the whole document in particular paragraph [0053]	1-6
	-/-	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/063081

(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FUJII HISAKI ET AL: "Inflammatory markers and autoantibodies that correlate with early and late onset of new onset pediatric chronic graft-versus-host disease (GVHD)." BLOOD, vol. 108, no. 11, Part 1, November 2006 (2006-11), page 923A, XP009114382 & 48TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; ORLANDO, FL, USA; DECEMBER 09 -12, 2006 ISSN: 0006-4971 the whole document</p>	1-6
A	<p>SARANTOPOULOS STEFANIE ET AL: "BAFF/B1ys levels correlate with disease activity and alter peripheral B cell subsets in patients with chronic GVHD." BLOOD, vol. 108, no. 11, Part 1, November 2006 (2006-11), page 17A, XP002520978 & 48TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; ORLANDO, FL, USA; DECEMBER 09 -12, 2006 ISSN: 0006-4971 the whole document</p>	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/063081

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p style="text-align: center;">see additional sheet</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1, 2, 3 (partially), 4, 5, 6 (partially)</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>

International Application No. PCT/EP2008 /063081

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-6 (partially)

Use of BLYS as a diagnostic and prognostic marker for organ specific autoimmune disease.

2. claims: 1-6 (partially)

Use of BLYS as a diagnostic and prognostic marker for immune mediated diseases related to blood transfusion.

3. claims: 3,6 (partially)

Use of BLYS as a diagnostic and prognostic marker for immunological deficiencies.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/063081

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004074511 A	02-09-2004	NONE	
WO 2007056288 A	18-05-2007	US 2008268480 A1	30-10-2008

 フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 デ ヴィタ, サルヴァトーレ
 イタリア, イ - 3 3 1 0 0 ウーディネ, ヴィア イレーネ ディ スピリムベルゴ, 1 2

(72)発明者 ファブリス, マルチナ
 イタリア, イ - 3 3 1 0 0 ウーディネ, ヴィア ファガーニャ, 3 7 / 1 9

(72)発明者 トヌッティ, エリオ
 イタリア, イ - 3 3 1 0 0 ウーディネ, ヴィア チコーニャ, 4 8 / アー

(72)発明者 メッリー, クリスティナー
 イタリア, イ - 3 3 1 0 0 ウーディネ, ヴィア イレーネ ディ スピリムベルゴ, 1 2

Fターム(参考) 4C084 AA17 NA20 ZB07 ZB08 ZC02

专利名称(译)	利用细胞因子B淋巴细胞刺激因子 (BLYS) 血清学检测作为免疫相关输血反应的预测试验和监测试验		
公开(公告)号	JP2010540948A	公开(公告)日	2010-12-24
申请号	JP2010527431	申请日	2008-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	海胆威赛西塔大邱名单©老爹乌迪内 UNIV DEGLI STUDI DI UDINE		
申请(专利权)人(译)	Univerushita德利阿布鲁Studi住宅迪乌迪内		
[标]发明人	クルチオフランチェスコ デヴィタサルヴァトーレ ファブリスマルチナ トヌッティエリオ メッリークリスティナー		
发明人	クルチオ,フランチェスコ デヴィタ,サルヴァトーレ ファブリス,マルチナ トヌッティ,エリオ メッリー,クリスティナー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P43/00 A61P37/06 A61P37/02		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/6863 G01N2333/525 G01N2800/046 G01N2800/24 G01N2800/50 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/53.P A61K45/00 A61P43/00.111 A61P37/06 A61P37/02		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/NA20 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZC02		
优先权	102007901560481 2007-10-01 IT		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

涵盖在患者中，器官特异性自身免疫性疾病（例如，腹部疾病和自身免疫性甲状腺炎），和/或输血反应和/或IgA缺乏，免疫介导的疾病的诊断，预测的过程中，和治疗功效血清细胞因子B淋巴细胞刺激的筛选测定因子（BLYS）以下的使用包括以下步骤。分析血样以确定细胞因子BLYS的浓度并确定前一步骤中测定的BLYS水平和细胞因子BLYS的浓度为1将参考值与一个或多个参考值进行比较的步骤;鉴定所确定的Token BLYS浓度与细胞因子BLYS浓度参考值之间的显著偏差，并基于前一步骤和如上所述对免疫介导的疾病进行诊断，并且/或进行预测和/或确定治疗效果。

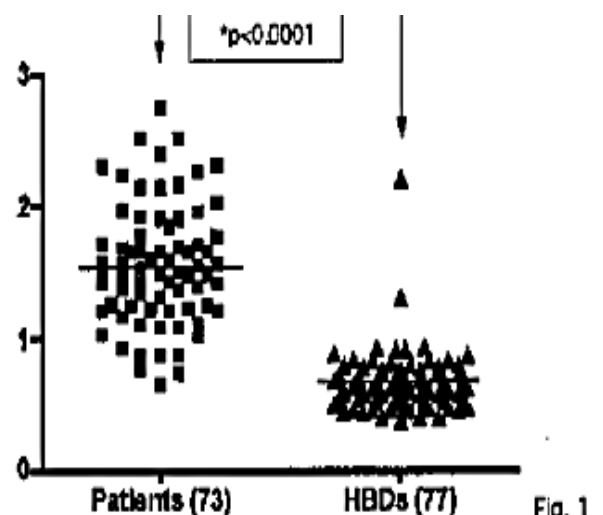


Fig. 1