

(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2018-532995

(P2018-532995A)

(43) 公表日 平成30年11月8日(2018.11.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851	Z
C 1 2 Q 1/6809 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6809	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2018-512387 (P2018-512387)  
 (86) (22) 出願日 平成28年9月8日(2016.9.8)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年3月7日(2018.3.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/071149  
 (87) 国際公開番号 W02017/042253  
 (87) 国際公開日 平成29年3月16日(2017.3.16)  
 (31) 優先権主張番号 102015115158.8  
 (32) 優先日 平成27年9月9日(2015.9.9)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(71) 出願人 597075904  
 フレゼニウス メディカル ケア ドイツ  
 チェランド ゲゼルシャフト ミット ベ  
 シュレンクテル ハフツング  
 ドイツ連邦共和国 デー61352 バッ  
 ト ホンブルク エルゼ クレーナー ス  
 トラーセ 1  
 (74) 代理人 100100158  
 弁理士 鮫島 睦  
 (74) 代理人 100132263  
 弁理士 江間 晴彦  
 (72) 発明者 ユッタ・プラスリッケーデトイエン  
 ドイツ77960ゼールバッハ、ヴァイラ  
 ー7番

最終頁に続く

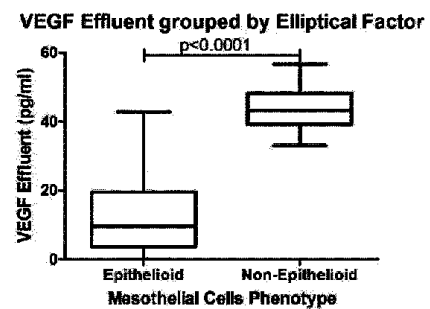
(54) 【発明の名称】 腹膜の上皮間葉転換 (EMT) の診断方法および診断キット

(57) 【要約】

本発明は、腹膜透析の際にしばしば生じる、中皮間葉転換 (MMT) などの上皮間葉転換 (EMT)、特に腹膜の EMT の診断の分野に関する。本発明は、少なくとも 1 つの細胞外マトリックスのタンパク質、例えばコラーゲン 1 3、コラーゲン 6 および/もしくはケラチン 3 4、少なくとも 1 つの細胞外マトリックスの構築および/または再構築に関与するタンパク質、例えばマトリックス・メタロプロテイナーゼ 1、少なくとも 1 つの細胞 - 細胞接触および/または細胞 - マトリックス接触に関与するタンパク質、例えばカドヘリン 1 3 もしくはトロンボスポンジン 1、少なくとも 1 つの増殖因子、例えば VEGF、ならびにオプションとして、少なくとも 1 つの BMP 拮抗薬、例えばグレムリン 1、を含んで成るマーカーに基づく方法およびキットを供する。

【選択図】 図 1

Fig. 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

サンプル中のマーカーの検出剤を含んで成る、上皮間葉転換（EMT）の診断キットであって、

マーカーが、

- a) 細胞外マトリックスのタンパク質、
- b) 細胞外マトリックスの構築および/または再構築に關与するタンパク質、
- c) 細胞 - 細胞接触および/または細胞 - マトリックス接触に關与するタンパク質、
- d) 成長因子、ならびに
- e) オプションとして、BMP拮抗薬

を含んで成る、

診断キット。

10

## 【請求項 2】

サンプル中の複数のマーカーの非存在および/または量を検出することを含んで成る、上皮間葉転換（EMT）の診断方法であって、

マーカーが、

- a) 細胞外マトリックスのタンパク質、
- b) 細胞外マトリックスの構築および/または再構築に關与するタンパク質、
- c) 細胞 - 細胞接触および/または細胞 - マトリックス接触に關与するタンパク質、
- d) 成長因子、ならびに
- e) オプションとして、BMP拮抗薬

を含んで成る、

診断方法。

20

## 【請求項 3】

サンプル中のマーカーの検出剤が、抗体またはその断片である、請求項 1 に記載の診断キットまたは請求項 2 に記載の診断方法。

## 【請求項 4】

サンプル中のマーカーの検出剤が、固体サポートに結合されており、キットが好ましくは抗体チップを含んで成る、請求項 1 もしくは 3 に記載の診断キットまたは請求項 2 ~ 3 のいずれかに記載の診断方法。

30

## 【請求項 5】

細胞外マトリックスのタンパク質が、ケラチン 3 4 を含んで成る群から選択されるケラチン、ならびに/またはコラーゲン 1 3 およびコラーゲン 6 を含んで成る群から選択されるコラーゲンであり、

マーカーが、好ましくは細胞外マトリックスのタンパク質であるケラチン 3 4、コラーゲン 1 3 およびコラーゲン 6 を含んで成る、請求項 1 もしくは 3 ~ 4 のいずれかに記載の診断キットまたは請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の診断方法。

## 【請求項 6】

細胞外マトリックスの構築および/または再構築に關与するタンパク質が、マトリックス・メタロプロテナーゼ 1 を含んで成る群から選択されるマトリックス・メタロプロテナーゼである、請求項 1 もしくは 3 ~ 5 のいずれかに記載の診断キットまたは請求項 2 ~ 5 のいずれかに記載の診断方法。

40

## 【請求項 7】

細胞 - 細胞接触および/または細胞 - マトリックス接触に關与するタンパク質が、カドヘリン 1 3 を含んで成る群から選択されるカドヘリンおよび/またはトロンボスポンジン 1 を含んで成る群から選択されるトロンボスポンジンであり、

マーカーが、好ましくはカドヘリン 1 3 およびトロンボスポンジン 1 を含んで成る、請求項 1 もしくは 3 ~ 6 のいずれかに記載の診断キットまたは請求項 2 ~ 6 のいずれかに記載の診断方法。

## 【請求項 8】

50

成長因子が V E G F である、請求項 1 もしくは 3 ~ 7 のいずれかに記載の診断キットまたは請求項 2 ~ 7 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 9】

B M P 拮抗薬がグレムリン 1 である、請求項 1 もしくは 3 ~ 8 のいずれかに記載の診断キットまたは請求項 2 ~ 8 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 10】

マーカーが、カドヘリン 13、コラーゲン 13、コラーゲン 6、ケラチン 34、マトリックス・メタロプロテアーゼ 1、トロンボスポンジン 1、V E G F およびグレムリン 1 である、請求項 1 もしくは 3 ~ 9 のいずれかに記載の診断キットまたは請求項 2 ~ 9 のいずれかに記載の診断方法。

10

【請求項 11】

マーカーの増加量が、上皮間葉転換 ( E M T ) を示す、請求項 1 もしくは 3 ~ 10 のいずれかに記載の診断キットまたは請求項 2 ~ 10 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 12】

上皮間葉転換が、腹膜の上皮間葉転換であり、好ましくは、サンプルが腹膜透析患者に由来する、請求項 1 もしくは 3 ~ 11 のいずれかに記載の診断キットまたは請求項 2 ~ 11 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 13】

サンプルが、

a ) 腹膜流出物、腹水、血清、腹膜組織を含んで成る患者から得られるサンプル、および

20

b ) 腹膜透析のモデルとして有用な、細胞または組織培養物から得られる培養培地または細胞溶解物

を含んで成る群から選択される、請求項 1 もしくは 3 ~ 12 のいずれかに記載の診断キットまたは請求項 2 ~ 12 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 14】

上皮間葉転換を診断するための、好ましくは、腹膜透析患者の腹膜の上皮間葉転換を診断するための、請求項 1 または 3 ~ 13 のいずれかに記載の診断キットの使用。

【請求項 15】

請求項 1 もしくは 3 ~ 13 のいずれかに記載の診断キットおよび / または請求項 2 ~ 13 のいずれかに記載の診断方法を用いて、患者の組織の状態を分析することを含んで成る、患者の組織、好ましくは腹膜の上皮間葉転換の進行を予測する、方法。

30

【請求項 16】

請求項 1 もしくは 3 ~ 13 のいずれかに記載の診断キットおよび / または請求項 2 ~ 13 のいずれかに記載の診断方法を用いて、患者の腹膜の状態を分析することを含んで成る、腹膜透析患者の治療を最適化する方法であって、該治療が患者の腹膜の状態に合わせられる、方法。

【請求項 17】

腹膜透析溶液の検査方法であって、

a ) 腹膜のモデルとして作用する腹膜または細胞または組織培養物と、溶液とを接触させること、

40

b ) 請求項 1 もしくは 3 ~ 13 のいずれかに記載の診断キットおよび / または請求項 2 ~ 13 のいずれかに記載の診断方法を用いて、腹膜または細胞または組織培養物の状態を分析すること

を含んで成る、検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腹膜透析の際にしばしば生じる上皮間葉転換 ( または上皮から間葉への移行、epithelial-to-mesenchymal transition、E M T )、特に中皮間葉転換 ( mesothelial-

50

to-mesenchymal transition、M M T)、特に腹膜の E M T の診断の分野に関する。本発明は、少なくとも 1 つの細胞外マトリックスのタンパク質、例えばコラーゲン 1 3、コラーゲン 6 および / もしくはケラチン 3 4、少なくとも 1 つの細胞外マトリックスの構築および / または再構築に関与するタンパク質、例えばマトリックス・メタロプロテイナーゼ 1、少なくとも 1 つの細胞 - 細胞接触および / または細胞 - マトリックス接触に関与するタンパク質、例えばカドヘリン 1 3 もしくはトロンボスポンジン 1、少なくとも 1 つの増殖因子、例えば V E G F、ならびにオプシオンとして、少なくとも 1 つの B M P 拮抗薬、例えばグレムリン 1 を含んで成るマーカーに基づく方法およびキットを供する。

【背景技術】

【0002】

腹膜透析 (peritoneal dialysis、P D) は、透析人口の約 1 0 ~ 1 5 % にわたる末期腎疾患の治療における、血液透析 (hemodialysis、H D) の有効かつ費用効率の高い代替法である。P D 中に、腹膜組織または腹膜は、限外濾過および拡散が起こる半透膜として機能する。しかしながら、P D の長期使用は未だに限定される。5 0 % 近くの患者が、P D の治療から 4 年または 5 年以内に血液透析に切り替えることを余儀なくされている。生体非適合性の (またはバイオインコンパティブルな、bioincompatible) P D 液への長時間の曝露、腹膜炎および腹膜の症状の発現 (expression) は、腹膜組織の変性変化を誘発し、最終的に限外濾過が失敗する。これらの腹膜の進行性の機能的および形態学的変化は、P D 液における高濃度のグルコース、低 p H および乳酸緩衝液によって引き起こされ得、炎症反応、中皮細胞 (mesothelial cell、M C) 単層の漸次的な浸食 (または露出、denudation)、副皮質線維症および新血管新生によって反映される。

【0003】

長期間の P D の間、M C は、上皮特徴の進行性喪失を受け、筋線維芽細胞様表現型 (myofibroblast-like phenotype) を獲得する。上皮間葉転換 (E M T) は、頂端 - 側底極性の喪失 (the loss of apical-basolateral polarity)、細胞間接合の破壊ならびに移動性および侵襲性の獲得を特徴とする、複雑で段階的なプロセスである (Selgas ら (2006) による「腎臓病学のダイアル移植 (Nephrol Dial Transplant) 21 [補遺 (Suppl) 2] ii2-ii7、Aroeira ら (2007) による「自己組織化腎臓病学の米国学会誌 (J Am Soc Nephrol) 18:2004-2013」)。E M T を受ける M C は、細胞外マトリックス成分ならびに炎症性 (inflammatory)、線維形成性 (fibrogenic) および血管新生因子 (angiogenic factors) を生成する能力を獲得する。腹膜組織の E M T の進行中に、変換成長因子 (transforming growth factor) T G F - 1 および血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor、V E G F) の上方制御 (またはアップレギュレーション、upregulation) を介して、腹膜線維症および血管形成が誘発される。

【0004】

現在のところ、P D 中の腹膜の変化は避けられないが、例えば生体適合性溶液または別の治療スキーム (例えば、充填量および / または滞留時間の変更) による最適化処理は、少なくともこれらの変化を遅らせることができる。E M T は少なくとも初期段階では可逆的なプロセスである。さらに、P D 処理の効率は、患者の腹膜の状態に基づいて最適化されてもよい。

【0005】

E M T は、P D の間の腹膜の変化に関与するのみでなく、胚形成および創傷治癒においても役割を果たす生物学的プロセスである。E M T はまた、器官の線維化を引き起こし、癌の進行および転移に影響を及ぼし得る。E M T はまた、肺を含む様々な器官における癌または変性線維性疾患などの種々の疾患の病因に寄与することも示している (WO2014/139885 A2)。

【0006】

WO2014/139885 A2 は、マトリックス・メタロプロテイナーゼ M M P 1 0、細胞性および可溶性フィブロネクチン、E - カドヘリンならびにビメンチンが E M T のマーカーであることを教示している。従来技術において、E M T に関連する、E M T または一般的には線

10

20

30

40

50

維症のいくつかのさらなるマーカーが確認されている。例えば、WO2011/054893 A2は、T L R - 9 発現のレベルと線維症との間の関連を示す。WO2012/042091は、T A K 1 の測定（または判定、determination）に基づいて線維症の進行を測定する方法を教示している。US2013/0303563 A1は、ペリオスチン、H S P G 分解、P D G F、レプチン、およびC D 6 8 + マクロファージ密度が腹膜損傷のマーカーであることを開示している。US2013/20940 A1は、B M P 9 またはB M P 1 0 の測定が、線維性疾患を発症するリスクを評価するのに有用であることを示している。Aroeiraら（2007）は、P D 患者の腹膜において、E - カドヘリン、サイトケラチン、クローディン、オクルディン、デスモブラキン、Z O - 1、ムチン - 1、t P A およびC D 3 4 の発現の減少、ならびにN - カドヘリン、スネイル、ビメンチン、T G F - 、ファプロネクチン、細胞外マトリックスのタンパク質、特にコラーゲンIおよびIII、S M A、F G F - 1 およびF G F - 2、M M P - 2 およびM M P - 9、F S P - 1、P A I - 1、V E G F、ならびにシクロオキシゲナーゼ - 2 などの発現の増加を教示する。

10

#### 【0007】

しかしながら、E M T を受ける組織の機能、例えばP D における腹膜の濾過能力と密接に関連するE M T のマーカーを供する必要性に対する課題が残っている。本発明者らは、そのようなマーカーを供する課題を解決し、対応するキットおよびE M T を診断するための方法を見出した。本発明の保護対象は、例えば、添付の特許請求の範囲によって説明される。

#### 【発明の概要】

20

#### 【0008】

本発明は、サンプル中の複数のマーカーの非存在および/または量を検出することを含んで成る、上皮間葉転換（E M T）、特にM M T、または最も好ましくは腹膜のE M T の診断方法を供し、マーカーが以下を含んで成る。

- a) 細胞外マトリックスのタンパク質（extracellular matrix protein）、
- b) 細胞外マトリックスの構築および/または再構築に関与するタンパク質（protein involved in building and/or restructuring of extracellular matrix）、
- c) 細胞 - 細胞接触および/または細胞 - マトリックス接触に関与するタンパク質（protein involved in cell-cell and/or cell-matrix contacts）、
- d) 成長因子（growth factor）、ならびにオプシオンとして、
- e) B M P 拮抗薬（antagonist）。

30

#### 【0009】

本発明の文脈において、冠詞「1の(a)」は、他に明示的に指定されない限り、「1またはそれ以上の(one or more)」を意味すると解される。したがって、例えば、マーカーはまた、2または3（またはそれ以上の）の細胞外マーカーのタンパク質または細胞 - 細胞接触および/または細胞 - マトリックス接触に関与する2または3のタンパク質を含み得る。

#### 【0010】

本発明はまた、サンプル中のマーカーの検出剤（または試薬、agent）を含んで成る、上皮間葉転換（E M T）の診断に対応するキットを供し、マーカーが以下を含んで成る。

40

- a) 細胞外マトリックスのタンパク質、
- b) 細胞外マトリックスの構築および/または再構築に関与するタンパク質、
- c) 細胞 - 細胞接触および/または細胞 - マトリックス接触に関与するタンパク質、
- d) 成長因子、ならびにオプシオンとして、
- e) B M P 拮抗薬。

#### 【0011】

好ましくは、マーカーがタンパク質形態である場合、サンプル中のマーカーの検出剤は、抗体またはその断片（fragment）である。抗体は、タンパク質形態のマーカーの検出に適している。抗体またはその断片は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヤギ、ネコ、トリ、例えばニワトリ、またはキメラ起源のものであってもよい。それらは、ポ

50

リクローナルまたはモノクローナルであってもよく、または遺伝子工学によって生成されてもよい。抗体の断片は、例えばFab断片、Fab<sub>2</sub>断片、scFvを含んで成る。

【0012】

あるいは、サンプル中のマーカの検出剤は、核酸、例えば核酸形態におけるマーカの検出剤に適している、特にマーカのRNA転写物またはそれに由来するcDNAの検出のためのマーカの検出に適している、RNAまたはDNAであってもよい。核酸は、好ましくは少なくとも部分的に一本鎖であり、またマーカをエンコードする核酸と厳しい(stringent)条件下でハイブリダイズ(hybridizing)することができる。

【0013】

好ましくは、サンプル中のマーカの検出剤は、個体サポート(または支持体、support)、例えば磁性を有し得る、チップ、異なるサイズのビーズなどに結合され(または連結され、linked)てもよい。好ましくは、キットは、マイクロアレイ、特に抗体マイクロアレイ(抗体チップ(antibody chip)とも称される)を含んで成る。本発明に適合させることができる適切な抗体チップ・フォーマットは、例えば、Wingrenらによる「分子生物学における方法(Methods Mol Biol.) 509:57-84、2009」、Chagaらによる「分子生物学における方法 441:129-51、2008」に開示されており、またはAbnova Corporation、R&D Systems、Full Moon BioSystems、Raybiotech, Inc.、BioSimsなどの会社によってカスタム・メイドされていてもよい。

【0014】

本発明者らは、健康な中皮細胞(腎不全のない患者の腹膜網(omentum)から得られた細胞)、類上皮細胞(epithelioid cells)(すなわち、PD患者の流出物(または流出液、effluent)から得られる、中皮細胞と同様の表現型(phenotype)を有する中皮細胞/MMTのEMTの第1段階の細胞)、およびEMTの進行段階における細胞(すなわち、表現型を変えた細胞、非類上皮細胞とも呼ばれる細胞)の遺伝子発現を分析した。細胞が非類上皮細胞表現型を獲得すると、顕著かつ特異的に上方調整されるいくつかの遺伝子が確認された。それらの発現および機能との相関を検証し、血清および流出物を含む種々の体液中のそれぞれのタンパク質レベルを調べた。驚くべきことに、本発明者らは、いくつかの官能基由来のマーカがEMTにおいて重要な役割を果たすことを見出した。本発明者らはさらに、これらのマーカのRNAおよびタンパク質の両方のレベルが、患者からの入手可能な臨床パラメータと相関し、それらの調整が機能的に完了すること(functional conclusions)を可能にすることを見出した。特に、本発明のマーカは、EMTの早期段階と進行段階とを区別することも可能にする。例えば、CDH13、COL6A3、COL13A1、THBS1およびMMP1のmRNAレベルは、EMTの早期および進行期の間での識別(または区別、discrimination)を可能にし、腹膜水輸送/限外濾過の臨床データと相関する。

【0015】

本発明にしたがって分析されるマーカの少なくとも1つ、好ましくは2つまたは3つは、細胞外マトリックスのタンパク質である。それは、ケラチン34(keratin 34)(KRT34)を含んで成る群から選択されるケラチン、ならびに/またはコラーゲン13(collagen 13)(COL13A1)およびコラーゲン6(collagen 6)(COL6A1)を含んで成る群から選択されるコラーゲンであってもよい。好ましくは、マーカは、細胞外マトリックスのタンパク質のケラチン34、コラーゲン13およびコラーゲン6を含んで成る。細胞外マトリックスのタンパク質の群からの代替マーカまたは追加マーカは、コラーゲン1および/またはコラーゲン3を含んで成る(Selgasら(2006)、Aroeiraら(2007))。

【0016】

本発明にしたがって分析されるマーカの少なくとも1つは、細胞外マトリックスの構築および/または再構築に關与するタンパク質である。それは、マトリックス・メタロプロテイナーゼ1(matrix metalloproteinase 1)(MMP1)を含んで成る群から選択されるマトリックス・メタロプロテイナーゼであってもよい。細胞外マトリックスの構築お

10

20

30

40

50

よび/または再構築に關与するタンパク質の群からの代替的または追加マーカーは、M M P 2、M M P 9 および/またはM M P 1 0 を含んで成る (Selgasら (2006)、Aroeiraら (2007)、US2013/0303563 A1、WO2014/139885 A2)。

【0017】

本発明にしたがって分析される少なくとも1つ、好ましくは2つのマーカーは、細胞-細胞接触および/または細胞-マトリックス接触に關与するタンパク質である。カドヘリン13 (cadherin 13) (C D H 1 3) を含んで成る群から選取されるカドヘリンであってもよく、および/またはトロンボスポンジン1 (thrombospondin 1) (T H B S 1 またはT P S 1) を含んで成る群から選取されるトロンボスポンジンであってもよい。好ましくは、マーカーは、カドヘリン13 およびトロンボスポンジン1 を含んで成る。

10

【0018】

細胞-細胞接触および/または細胞-マトリックス接触に關与するタンパク質の群からの代替マーカーまたは追加マーカーは、N-カドヘリン、E-カドヘリン (C D H 1)、C D 4 4、ピメンチンまたはフィブロネクチンである (Selgasら (2006)、Aroeiraら (2007))。

【0019】

本発明にしたがって分析されるマーカーの少なくとも1つは、成長因子、例えば血管新生を促進する成長因子であり、成長因子は、好ましくは血管内皮増殖因子であるV E G F (Selgasら (2006)) であり、Aroeiraら (2004) はE M TにおけるV E G Fの役割を教示している。増殖因子の群からの代替マーカーまたは追加マーカーは、T G F - 、F G F - 1、F G F - 2 (Aroeiraら (2007)) である。

20

【0020】

オプションとして、本発明にしたがって分析されるマーカーは、B M P拮抗薬、好ましくはグレムリン1 (D A NファミリーB M P拮抗薬またはG R E Mとも称される) である。Leeら (2007) による「眼科学および視覚科学に関する研究学会誌 (Investigative Ophthalmology & Visual Science) September 2007, Vol.48, 4291-4299」は、グレムリン1が増殖性硝子体網膜症 (proliferative vitreoretinopathy) におけるE M Tに關与していることを教示している。好ましくは、G R E MなどのB M P拮抗薬は、潜在的にE M Tを受ける細胞、特にP D患者の流出物からの細胞の上清 (または浮遊物、supernatant) において測定される。発明者らは、流出物におけるG R E Mの発現がE M Tと有意に關連していないため、流出物の分析がG R E MのようなB M P拮抗薬の分析を含む必要はないことを示した。

30

【0021】

オプションのさらなるマーカーには、組織因子経路阻害剤 (Tissue Factor Pathway Inhibitor、T F I 2)、トロンボモジュリン (Thrombomodulin、T H B D)、アクアポリン1 (Aquaporin 1、A Q P 1) および/またはキナーゼ・インサート・ドメイン受容体 (Kinase Insert Domain Receptor、K D R) が含まれる。

【0022】

好ましい態様では、マーカーは、カドヘリン13、コラーゲン13、コラーゲン6、ケラチン34、マトリックス・メタロプロテアーゼ1、トロンボスポンジン1、V E G F、およびオプションとしてグレムリン1である。

40

【0023】

本発明者らは、上述したマーカーの増加量が上皮間葉転換 (E M T) を示すことを見出した。マーカーの量は、対照サンプル (control sample)、例えば健康な被験体 (subject)、例えばP Dを受けていないヒトから採取したサンプル、好ましくは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10または少なくとも20の健康な被験体からのサンプルを含んで成るそのような対照サンプルのプールと比較することができる。あるいは、標準サンプル (standards) を用いて分析対象のサンプル中のマーカーの量を測定し、その結果を対照サンプルまたはそのプールから得られた結果と比較することができる。

50

## 【0024】

2またはそれ以上の時点で（例えば処理前に（例えば腹膜の状態を分析する場合、PDの前に）、処理後に（例えば特定の時間でPDを用いて、例えば少なくとも1ヶ月後、少なくとも6ヶ月後、少なくとも1年後、少なくとも2年後、少なくとも3年後、少なくとも4年後、少なくとも5年後、少なくとも6年後、少なくとも7年後、少なくとも8年後、少なくとも9年後、少なくとも10年後、少なくとも11年後、少なくとも12年後、少なくとも13年後、少なくとも14年後、少なくとも15年後、または少なくとも20年後に））同じ被験体のマーカーの量を比較することも可能である。EMTは可逆的であり得るので、治療レジメン（または投薬計画、regimen）の変更、または使用されるPD流体の変更後にも分析を行うこともできる。

10

## 【0025】

好ましくは、本発明を通して、上皮間葉転換は腹膜の上皮間葉転換であり、好ましくは、サンプルは腹膜透析患者、例えば慢性腎疾患を有するPD患者に由来する。本発明者らは、驚くべきことに、本発明のマーカーのセットが、腹膜の機能、特に腹膜による濾過の有効性と密接な関連を示すことを見出した。

## 【0026】

PDは、例えばCAPD（連続歩行型腹膜透析、continuous ambulatory peritoneal dialysis）、CCPD（連続的な周期PD、continuous cyclic PD）、IPD（断続的PD、intermittent PD）、またはNIPD（夜間断続的PD、nightly intermittent PD）であってもよい。

20

## 【0027】

胚形成または創傷治癒に關与するEMTを分析することも興味深い。EMTの診断は、PDに加えて、癌の進行および転移（特に腹部癌進行および腹膜転移）において、または（WO2014/139885 A2で開示されているような）肺を含む種々の器官における変性線維性疾患において、または術後の腹膜癒着形成において、臨床的に關連する。一般的に、EMTは腹膜疾患のマーカーとすることができる。

## 【0028】

サンプルは、潜在的にEMTを受けているあらゆる生物学的サンプルに由来してもよい。例えば、変性線維性障害を受けている器官または組織に由来するサンプルであってもよい。患者の体液、例えば患者の腹水、血液、血清または血漿であってもよい。サンプルがPD患者由来である場合、サンプルは、好ましくは、腹膜流出物（すなわち、使用後の腹膜透析液）、腹水、血清、血漿、もしくは腹膜組織から選択されるか、またはそれらからの由来物（例えば、腹膜流出物からの培養細胞の上清）であってもよい。本発明者らは、腹膜流出物に基づいて優れた結果が得られることを示した。

30

## 【0029】

サンプルはまた、EMTのモデル（例えば腹膜透析のモデル）として有用な、細胞または組織培養物（tissue culture）から得られる培養培地（または培養媒体、culture medium）または細胞溶解物（cell lysate）から選択することができる。例えば、ARPE-19細胞はEMTの有用なモデルであることが示された（Leeら（2007））。別のモデルは、例えば、PDのマウスモデルである。

40

## 【0030】

本発明はまた、好ましくは、腹膜透析患者の腹膜の上皮間葉転換の診断のために、上皮間葉転換の診断のための本発明のキットの使用を供する。EMTの状態、特に、腹膜の状態は、本発明のキットおよび方法を使用して測定することができ、早期段階と進行段階とを区別することができる。

## 【0031】

本発明はまた、本発明のキットおよび/または方法を用いて患者の組織の状態を分析することを含んで成る、患者の組織（好ましくは腹膜）の上皮間葉転換の進行を予測する方法を供する。組織はまた、癌であり得、したがって、癌の進行および/または転移の予測を可能にする。

50

## 【0032】

本発明はまた、本発明のキットおよび/または方法を用いて患者の腹膜の状態を分析することを含んで成る、腹膜透析患者の治療を最適化するための方法を供し、この治療は患者の腹膜の状態に合わせられる。この治療は、腹膜透析の可能な限り長い使用を可能にする方法で、および/または腹膜透析の効率を最適化する方法で適合させ得る。

## 【0033】

本発明はまた、以下を含んで成るPD溶液の検査方法を供する。

a) 腹膜のモデルとして作用する(または機能する、serving as)腹膜または細胞または組織培養物と、PD溶液とを接触させること、および

b) 本発明のいずれかの診断キットおよび/または方法を用いて、腹膜または細胞または組織培養物の状態を分析すること。

10

## 【0034】

PD溶液の検査方法は、インビボ(in vivo)またはインビトロ(in vitro)で行うことができる。本発明者らは、アクアポリン1(AQP1)の発現が生体非適合性のPD液の使用と相関するため、PD溶液を検査するためにこのマーカーの分析を含むことが好ましいことを示した。

## 【0035】

本明細書で引用した文献は、参照により本明細書に十分に組み込まれる。本発明は、以下の図、実施例および例示的な態様によりさらに説明されるが、本発明を限定することを意図するものではない。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0036】

【図1】図1は、E(類上皮細胞、epithelioid)およびNE(非類上皮細胞、non-epithelioid)に分類された、患者からの流出物におけるVEGFの発現を示し、タンパク質は抗体で定量された。分類は楕円係数(Elliptical Factor)に基づいて行った。各細胞培養物の2枚の写真を撮影した。10個の細胞をランダムに選択し、細胞の長軸および短軸を測定し、比を計算した。各培養物の平均を計算し、この平均値が2以上である場合(細胞がその幅の2倍以上の長さである場合)、培養物を非類上皮細胞として分類し、そうでなければ類上皮細胞として分類した。類上皮細胞 =  $12.73 \pm 12.81 \text{ pg/ml}$  (N = 20)、非類上皮細胞 =  $43.70 \pm 6.181 \text{ pg/ml}$  (N = 20)。

30

【図2】図2は、上記のように、E(類上皮細胞)およびNE(非類上皮細胞)に分類された、患者からの流出物におけるGREM1の発現を示し、タンパク質は抗体で定量された。類上皮細胞 =  $0.4405 \pm 0.3598 \text{ ng/ml}$  (N = 20)、非類上皮細胞 =  $0.3555 \pm 0.3756 \text{ ng/ml}$  (N = 20)。

【図3】図3は、上記のように、E(類上皮細胞)およびNE(非類上皮細胞)に分類された、患者からの流出物におけるトロンボスポンジン1の発現を示し、タンパク質は抗体で定量された。類上皮細胞 =  $5.791 \pm 7.669 \text{ ng/ml}$  (N = 20)、非類上皮細胞 =  $66.62 \pm 42.18 \text{ ng/ml}$  (N = 20)。

【図4】図4は、クレアチニンの物質移動係数(Cr-MTC)にしたがって分類された、患者からの流出物におけるトロンボスポンジン1の発現(すなわち腹膜を横切る輸送を決定するパラメーター)を示し、タンパク質は抗体で定量された。 $Cr-MTC < 11 = 19.19 \pm 26.11 \text{ ng/ml}$  (N = 26)、 $Cr-MTC > 11 = 67.81 \pm 50.66 \text{ ng/ml}$  (N = 14)。

40

【図5】図5は、楕円係数で分類された、患者からの流出物におけるCOL13の発現を示し、タンパク質は抗体で定量された。類上皮細胞 =  $166.4 \pm 120.1 \text{ ng/ml}$  (N = 33)、非類上皮細胞 =  $228.0 \pm 132.4 \text{ ng/ml}$  (N = 43)。

【図6】図6は、クレアチニンの物質移動係数(Cr-MTC)にしたがって分類された、患者からの流出物におけるCOL13の発現を示し、タンパク質は抗体で定量された。 $Cr-MTC < 11 = 189.8 \pm 132.8 \text{ ng/ml}$  (N = 51)、 $Cr-MTC > 11 = 243.8 \pm 108.6 \text{ ng/ml}$  (N = 23)。

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【実施例】

## 【0037】

## (実施例1)

示差的遺伝子発現研究 (Differential gene expression studies) は、PD患者の流出物に由来する培養された中皮細胞において実施された。PD患者に由来する、類上皮細胞表現型を有する9つのサンプルおよび非類上皮細胞表現型を有する8つのサンプルを対照プール (4つの異なる健康なドナーの腹膜網に由来する中皮細胞) と比較した。様々な群の誘導性遺伝子 (induced gene) または抑制遺伝子 (repressed gene) が得られ、RT-qPCRによって40の遺伝子が検証された。15の遺伝子のサブセット (または小集団、subset) の結果を表1に示す。さらに、生体適合性 (例えば、BicaVera) およびより生体適合性の低い (生体非適合性) PD流体 (例えば、Stay-safe) の使用にしたがって、表2に示すようにグループ分けした。表3は、生体非適合性PD流体の使用が、生体適合性PD流体の使用より高いEMT率をもたらすことを示す。表1および表2の結果は、本発明のマーカーの高い機能的意義を示す。

## 【0038】

CDH13、COL6A3、COL13A1、KRT34、MMP1、THBS1 (TPS1とも称される)、VEGFAおよびCDH1のmRNAは、類上皮細胞表現型および非類上皮細胞表現型の間で、またPD流体の、特徴的な生体適合性および生体非適合性の間で統計的な差を示した。CD44、TFPI2、KDRおよびTHBDは、類上皮細胞表現型および非類上皮細胞表現型の間で有意差を示し、AQP1は、生体適合性PD流体および生体非適合性PD流体の間で異なった。

## 【表1】

遺伝子	類上皮細胞			非類上皮細胞			P値
	N	平均	標準偏差	N	平均	標準偏差	
CD44	23	2.88	2.94	28	4.87	3.34	0.001
CDH13	23	15.07	13.96	28	26.16	23.03	0.049
COL6A3	23	8.80	10.07	28	18.03	20.91	0.020
COL13A1	23	1.39	1.34	28	3.16	3.54	0.016
GREM1	23	4.03	4.14	28	7.61	11.97	0.798
IL33	23	2.42	2.26	28	4.90	5.78	0.108
KRT34	23	7.59	8.23	28	27.21	33.15	0.012
MMP1	23	1.37	1.25	28	6.73	9.83	0.002
MMP2	23	3.97	3.90	28	4.64	3.27	0.116
TFPI2	23	5.80	5.35	28	10.57	9.91	0.016
THBS1	23	7.36	8.54	28	19.41	24.98	0.022
VEGFA	23	1.84	1.32	28	3.32	3.29	0.088
CDH1	23	0.61	0.46	28	0.25	0.25	0.001
KDR	23	0.87	0.55	28	0.63	0.52	0.041
THBD	23	0.46	0.53	28	0.19	0.12	0.047

10

20

30

【表 2】

遺伝子	生体適合性			生体非適合性			P値
	N	平均	標準偏差	N	平均	標準偏差	
CD44	28	3.53	2.94	23	4.51	3.66	0.135
CDH13	28	12.39	8.67	23	31.84	24.64	0.003
COL6A3	28	8.06	8.19	23	20.93	22.57	0.006
COL13A1	28	1.37	1.27	23	3.57	3.77	0.006
GREM1	28	5.45	9.19	23	6.66	9.80	0.977
IL33	28	3.70	5.34	23	3.88	3.82	0.140
KRT34	28	8.73	10.64	23	30.08	35.17	0.010
MMP1	28	4.27	9.49	23	4.36	5.12	0.066
MMP2	28	3.61	3.02	23	5.23	3.98	0.096
TFPI2	28	8.42	6.66	23	8.42	10.38	0.691
THBS1	28	5.78	5.31	23	23.96	26.41	0.000
VEGFA	28	1.90	1.85	23	3.57	3.24	0.007
CDH1	28	0.38	0.43	23	0.46	0.35	0.061
KDR	28	0.66	0.48	23	0.83	0.60	0.325
THBD	28	0.37	0.50	23	0.24	0.18	1.000

10

【表 3】

	生体非適合性	生体適合性	合計
非類 上皮細胞	30	16	46
類 上皮細胞	15	19	34
合計	45	35	80

20

P値 = 0.08

## 【0039】

(実施例 2)

酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay、E L I S A) により、26のPD患者の流出物に由来する中皮細胞の培養物から得られた上清においてタンパク質を測定し、PD処理開始時で26検体、12ヶ月で26検体、18カ月で20検体および24カ月で11検体(データ示さず)のように分布した。中皮細胞を、20%のFBSおよび50U/mlのペニシリン、50μg/mlのストレプトマイシンおよび2%のBiogro-2を添加したEarle's M199培地で培養した。細胞がコンフルエント(または密集、confluency)に達したとき、培地を24時間の間、新鮮な培地と交換した。上清を回収し、使用するまで-80で保存した。上清の分析のために、細胞溶解物中の全タンパク質で上清中のタンパク質を標準化した(normalized)。選択マーカーをELISAで分析した。TSP1、VEGF、MMP2、CDH13およびGREM1は、非類上皮細胞群において、これらのタンパク質のすべてがより多量であり、類上皮細胞表現型および非類上皮細胞表現型の間で異なる発現を示した。

30

40

## 【0040】

(実施例 3)

PD患者に由来する40の流出物をELISAによって分析し、タンパク質レベルの異なるマーカーについての例示的データを本明細書に含める。

## 【0041】

流出物中のVEGFは、類上皮細胞表現型および非類上皮細胞表現型の間で有意差を示した(図1)。これは、中皮細胞のEMTの進行に応じて、VEGFが増加することを示す。クレアチニン(Cr)の物質移動係数(MTC)は、腹膜輸送状態を示す臨床(clinical)パラメーターである。11よりも高いMTCは、病理学的腹膜輸送(pathological

50

peritoneal transport) に対して特徴的である。流出物における V E G F の結果を M T C でグループ分けすると、11 よりも高いかまたは 11 よりも低い M T C を有する患者間で統計学的差が観察され、V E G F は M T C > 11 群でより高かった。したがって、流出物における V E G F を用いて、腹膜組織の機能状態を測定し得る。生物非適合性(より攻撃的な流体)および生体適合性 P D 流体によってグループ化した場合、流出物における V E G F はまた、生体非適合性流体においてより多くの V E G F を有し、これらのグループ間で有意差を示した。

#### 【0042】

流出物における G R E M 1 は、類上皮細胞群においてより多量のタンパク質を有し、類上皮細胞表現型および非類上皮細胞表現型の間には有意な差異は見られなかったが(図2)、上清において差異は有意であり、非類上皮細胞表現型がより多量のタンパク質を示した。M T C によって分類された場合、流出物における G R E M 1 は、M T C < 11 群においてより高いレベルのタンパク質を有し、統計的差異を示した。G R E M 1 は、生体適合性 P D 流体および生体非適合性 P D 流体の間で有意差を示さなかった。

10

#### 【0043】

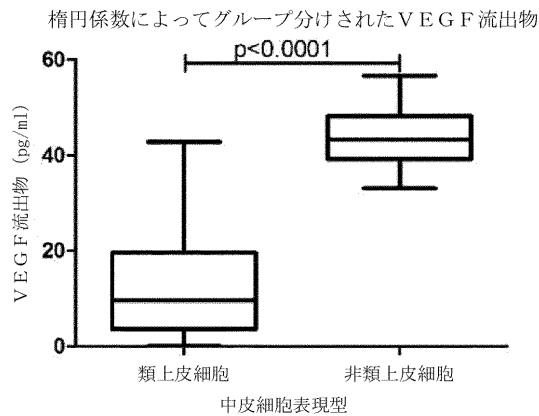
類上皮細胞表現型および非類上皮細胞表現型の間で(図3)、また M T C < 11 群または M T C > 11 群の間で(図4)、流出物における T S P 1 は有意差を示した。したがって、T S P 1 は、中皮細胞/MMTプロセスの E M T および腹膜組織における輸送と関連している。流出物における T S P 1 タンパク質は、生体適合性 P D 流体および生体非適合性 P D 流体の間で差異を示さなかったが、p 値 ( p = 0 . 1 6 ) は有意性を示す傾向を表す。

20

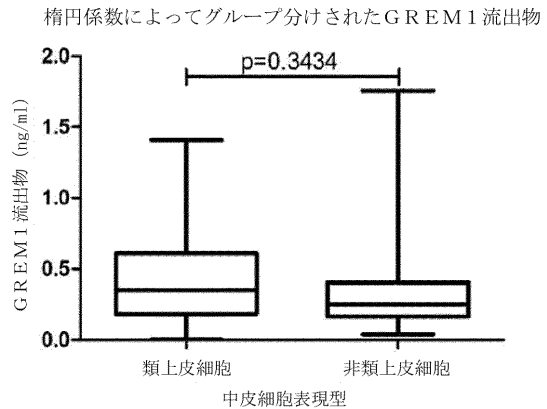
#### 【0044】

流出物における C O L 1 3 も分析され、表現型およびクレアチニン輸送に依存して差異を示した。

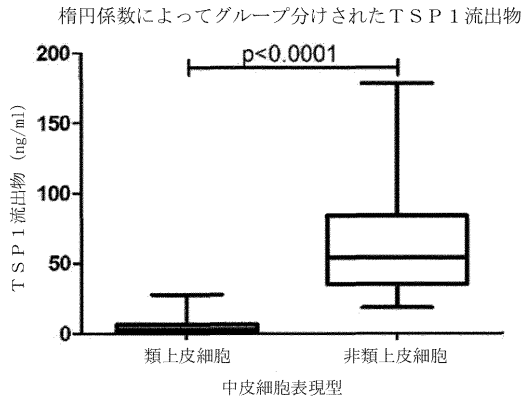
【図1】



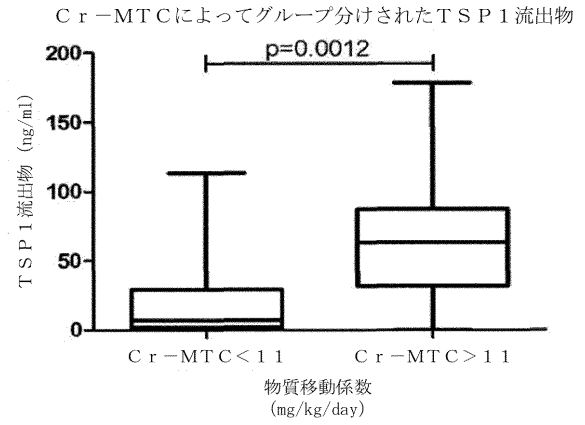
【図2】



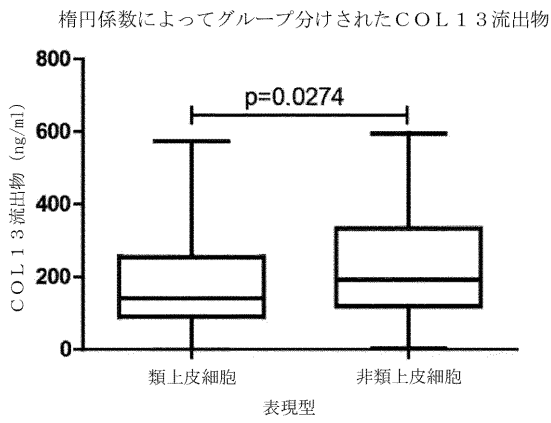
【 図 3 】



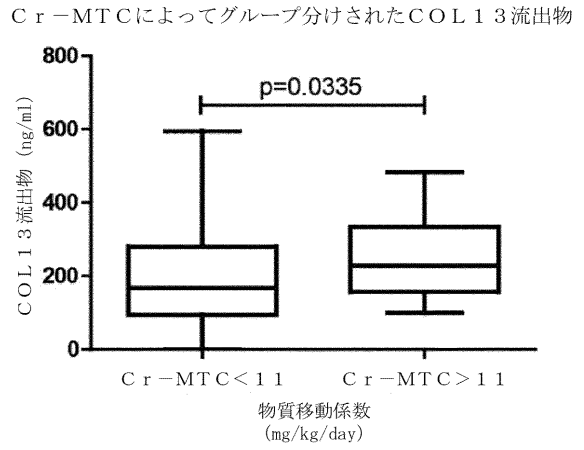
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/071149
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/569 C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q  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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2015/190430 A1 (LIM SAI KIANG [SG]) 9 July 2015 (2015-07-09) the whole document, in particular paragraph [0372] -----	1,3-9, 11-13 10,14-17
X A	WO 2010/064702 A1 (UNIV TOKYO [JP]; JAPAN HEALTH SCIENCE FOUND [JP]; GOTOH NORIKO [JP]) 10 June 2010 (2010-06-10) the whole document, in particular claims 1, 6, 11-13 -----	1,3-8, 11-13  9,10, 14-17
A	WO 2004/065602 A1 (UNIV MADRID AUTONOMA [ES]; YANEZ MO MARIA [ES]; LARA PEZZI ENRIQUE [ES]) 5 August 2004 (2004-08-05) the whole document, in particular title; abstract; claims -----	1-17
<input 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 October 2016		27/10/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Weber, Peter

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/071149

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2015190430	A1	09-07-2015	
		AU 2009215934 A1	27-08-2009
		CN 102014934 A	13-04-2011
		CN 104127438 A	05-11-2014
		DK 2254586 T3	15-06-2015
		EP 2254586 A1	01-12-2010
		ES 2537516 T3	09-06-2015
		HR P20150510 T1	05-06-2015
		JP 5718648 B2	13-05-2015
		JP 2011513217 A	28-04-2011
		KR 20100122087 A	19-11-2010
		PT 2254586 E	18-05-2015
		SI 2254586 T1	31-07-2015
		US 2011003008 A1	06-01-2011
		US 2015190430 A1	09-07-2015
		WO 2009105044 A1	27-08-2009
-----			
WO 2010064702	A1	10-06-2010	NONE
-----			
WO 2004065602	A1	05-08-2004	NONE
-----			

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, 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

(72) 発明者 ヤニネ・ビュッヘル

ドイツ 6 1 3 5 0 パート・ホンブルク、グラーフ - シュタウフェンベルク - リング 2 7 番

(72) 発明者 ゴーニャ・シュテッパン

ドイツ 6 3 2 6 3 ノイ - イーゼンブルク、アム・フォルストハウス・グラーフエンブルフ 5 3 番

(72) 発明者 マヌエル・ロベス - カブレラ

スペイン 2 8 0 4 9 マドリッド、ニコラス・カブレラ 1 番

(72) 発明者 アベラルド・アギレラ

スペイン 2 8 0 0 6 マドリッド、ディエゴ・デ・レオン 6 2 番

(72) 発明者 ラファエル・セルガス

スペイン 2 8 0 4 6 マドリッド、ペ・カステリャーナ 6 2 1 番

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA26 CB01 CB30 DA36 FB03

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ53 QQ79 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25

QS33 QX02

专利名称(译)	腹膜上皮间质转化 ( EMT ) 的诊断方法和诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018532995A</a>	公开(公告)日	2018-11-08
申请号	JP2018512387	申请日	2016-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	弗雷森纽斯医疗护理德国有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	费森尤斯医药Doitcherando GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
发明人	ユッタ・プラスリック・デートイエン ヤニネ・ビュッヘル ゾーニャ・シュテッパン マヌエル・ロペス・カブレラ アベラルド・アギレラ ラファエル・セルガス		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/6851 C12Q1/6809		
CPC分类号	G01N33/56966 C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N2333/4742 G01N2333/475 G01N2333/52 G01N2333/705 G01N2333/78 G01N2333/96494 G01N2800/347 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D C12Q1/6851.Z C12Q1/6809.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB30 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063 /QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QX02		
代理人(译)	绘马晴彦		
优先权	102015115158 2015-09-09 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及上皮间充质转换 ( EMT ) 领域，例如间皮间充质转换 ( MMT )，特别是腹膜EMT的诊断，其通常在腹膜透析期间发生。本发明是至少一种细胞外基质的蛋白质，如胶原蛋白13胶原6和/或角蛋白34，参与至少一种细胞外基质的结构和/或重建的蛋白质，例如基质金属蛋白酶1，至少一个细胞 - 细胞接触和/或细胞 - 参与基质接触蛋白质，例如钙粘着蛋白13或血小板反应蛋白1，至少一种生长因子，如VEGF，和任选的至少一种BMP拮抗剂，如gremlin 1。

Fig. 1

