

(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2011-526683

(P2011-526683A)

(43) 公表日 平成23年10月13日(2011.10.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	K
<b>GO 1 N 33/536 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/536	D
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 9 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2011-515464 (P2011-515464)	(71) 出願人	510339175 アボサイエンス アクチエンゲゼルシャフト
(86) (22) 出願日	平成21年7月2日 (2009.7.2)		APOSCIENCE AG
(85) 翻訳文提出日	平成23年2月23日 (2011.2.23)		オーストリア, アー-1010 ウィーン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/058354		, ラウエンシュタインガッセ 4/3
(87) 国際公開番号	W02010/000819		Rauhensteingasse 4/3, A-1010 Vienna, Austria
(87) 国際公開日	平成22年1月7日 (2010.1.7)	(74) 代理人	110000338 特許業務法人原謙三国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	08450097.4	(72) 発明者	アンカースミット, ヤン, ヘンドリック
(32) 優先日	平成20年7月2日 (2008.7.2)		オーストリア, アー-1040 ウィーン
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		, ヴァークガッセ 17/19/26

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞のCOPD診断

(57) 【要約】

被験者が慢性閉塞性肺疾患(COPD)を患う危険性を診断するための方法であって、被験者から試料を調製する工程と、上記試料中のCD4 + CD28null T細胞の量を決定する工程と、上記CD4 + 28null T細胞の量が、健康な被験者のCD4 + CD28null T細胞の量と比較して減少している場合に、COPDを患う危険性を診断する工程と、を有する方法。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験者が慢性閉塞性肺疾患（COPD）を患う危険性を診断するための方法であって、  
被験者から試料を調製する工程と、  
上記試料中のCD4 + CD28nul1 T細胞の量を決定する工程と、  
上記CD4 + CD28nul1 T細胞の量が、健康な被験者のCD4 + CD28nul1 T細胞の量と比較して減少している場合に、COPDを患う危険性を診断する工程と、を有する方法。

## 【請求項 2】

被験者の慢性閉塞性肺疾患（COPD）を診断するための方法であって、  
被験者から試料を調製して、当該試料中のCD4 + CD28nul1 T細胞の量を決定する工程と、  
上記CD4 + CD28nul1 T細胞の量が、健康な被験者のCD4 + CD28nul1 T細胞の量と比較して増加している場合に、COPDを診断する工程と、を有する方法。

10

## 【請求項 3】

上記試料は、血液であり、好ましくは、ヘパリン添加血液であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

上記CD4 + CD28nul1細胞の量は、抗CD4抗体および抗CD28抗体を用いて決定されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

上記CD4 + CD28nul1細胞の量は、フローサイトメトリー、特に、蛍光細胞分析分離装置（FACS）によって決定されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

上記健康な被験者のCD4 + CD28nul1 T細胞の量は、全CD4 + T細胞の集団の1.7% ~ 2.5%であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の方法。

30

## 【請求項 7】

上記COPDを患う危険性は、上記試料中のCD4 + CD28nul1細胞の量が、健康な被験者のCD4 + CD28nul1細胞の量と比較して、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%減少している場合に診断されることを特徴とする請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

上記COPDを患う危険性は、上記試料中のCD4 + CD28nul1 T細胞の量が、全CD4 + T細胞の集団の0.8% ~ 1.6%である場合に診断されることを特徴とする請求項 1、3 ~ 7 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

上記試料中のCD4 + CD28nul1 T細胞の量が全CD4 + T細胞の集団の2.7%よりも多い場合に、COPDが診断されることを特徴とする請求項 2 ~ 7 の何れか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 10】

被験者におけるCOPDステージI / IIとCOPDステージIII / IVとを区別するための方法であって、

COPDを患っている被験者から試料を調製する工程と、

上記試料中のCD4 + CD28nul1細胞の量を決定する工程と、

上記CD4 + CD28nul1細胞の量が、COPDステージIII / IVを患っている被験者に由来する試料中のCD4 + CD28nul1細胞の量と比較して減少している場合に、COPDステージI / IIが診断される工程、または、上記CD4 + CD28n

50

u l l 細胞の量が、C O P D ステージ I / I I を患っている被験者に由来する試料中の C D 4 + C D 2 8 n u l l 細胞の量と比較して増加している場合に、C O P D ステージ I I I / I V が診断される工程と、を有する方法。

【請求項 1 1】

上記 C D 4 + C D 2 8 n u l l T 細胞の量が全 C D 4 + T 細胞の集団の 2 . 7 % ~ 4 . 5 % である場合に、C O P D ステージ I / I I が診断されることを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

上記 C D 4 + C D 2 8 n u l l T 細胞の量が全 C D 4 + T 細胞の集団の 5 % ~ 1 2 % である場合に、C O P D ステージ I I I / I V が診断されることを特徴とする請求項 1 0 または 1 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

被験者における慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D ) の進行を観察するための方法であって、被験者から試料を調製する工程と、上記試料中の C D 4 + C D 2 8 n u l l 細胞の量を決定する工程と、上記被験者の上記試料中の上記 C D 4 + C D 2 8 n u l l 細胞の量と、上記被験者の以前の試料中の C D 4 + C D 2 8 n u l l 細胞の量とを比較する工程と、を有する方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

20

本発明は、被験者が慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D ) を患う危険性を診断するための方法に関する。

【0 0 0 2】

慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D ) は、世界的に、主要な死亡原因の一つである。2 0 2 0 年には、虚血性心疾患および脳血管疾患のみが、世界人口の間において、より高い死亡率を占める。過去数年で、蔓延率および入院率が劇的に上昇してきた。幾つかの研究によって、全ての喫煙者が C O P D の臨床的な特徴を示す訳ではないが、喫煙と C O P D の進行との間に強い因果関係があることが示されている ( Higenbottam T et al. (1980) Lancet 315:409-411 )。病原は、気道のリモデリング ( remodelling ) および異常な炎症に起因する気道閉塞によって特徴付けられる。C O P D は、慢性気管支炎および気腫を包含し、これらは共に、組織の破壊によって特徴付けられる。気流の制限が徐々に進行し、呼吸困難と運動能力の制限とを引き起こす。しかしながら、機能障害は肺に限定されず、C O P D の患者は、心疾患を含む全身的な障害を患う危険性も高い。Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases ( G O L D ) のガイドラインに従った気道閉塞の診断では、スパイロメトリー ( spirometry ) を使用する必要がある。気管支拡張薬後の ( Postbronchodilator ) F E V 1 / F V C ( 1 秒あたりの強制的な呼気量 / 強制肺活量 ) が 7 0 % 未満であることは、不可逆的な気道閉塞であることを示しており、それ故に、当該 F E V 1 / F V C は、C O P D の診断にとって主要なパラメーターであると考えられる ( Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. Global Initiative FOR Chronic Obstructive Lung Disease, 2007, www.goldcopd.com )。現在、患者は、肺活量データおよび臨床所見に基づいた複数の G O L D ステージに分類される。疾患の活動性 ( activity ) を示す血清中のマーカーを検出することは、診断プロセスおよび治療プロセスにおいて、特に注目されている。

30

40

【0 0 0 3】

喫煙は、上記疾患の主要な危険要因として広く認知されているが、特定の病原メカニズムの説明は、不明なままである。数十年間、好中球およびマクロファージ ( 先天性免疫の一部 ) が、C O P D を患っている患者に生じる気道のリモデリングプロセスにおいて重要であると考えられてきた。近年のレポートは、C O P D 患者の気管支肺胞洗浄物 ( BAL ) および唾液の中の C D 8 + 細胞および C D 4 + 細胞 ( 適応免疫システムの一部 ) の増加を証明することによって、上記病原論に挑戦してきた。これらの T リンパ球は、健康なドナ

50

—または非COPD喫煙者の細胞と比較して、より多くのパーフォリンを含むとともに、細胞傷害活性を示した。抗原刺激は、大きなクローンサイズへ成長する抗原特異的なT細胞の急激な増加を引き起こす。当該増加は、予めプログラムされたクローンの制限 (clonal contraction) によって平衡化される。この工程は堅固であって、様々な記憶T細胞を維持するために、通常は十分な工程である。しかしながら、慢性的な抗原に対する露出 (例えば、HIVウイルス感染、およびCMVウイルス感染) は、モノクローナルなT細胞集団の増加を引き起こす。更に、年齢が、T細胞のホメオスタシスに深く関わっている。

【0004】

COPDを診断するための臨床診療に用いられている唯一の方法はスパイロメトリーである。スパイロメトリーは肺の機能を測定する肺機能試験であって、特に、吸い込まれおよび吐き出され得る、気体の量 (体積) および / または速度 (流量) が測定される。しかしながら、この試験は、他の肺の疾患 (例えば、喘息および肺線維症) の診断にも用いられる。それ故に、このような方法は、COPDを信頼性高く診断するための唯一の試験として機能することはない。それ故に、医者は、COPDの診断のために、症状 (例えば、呼吸困難、慢性咳、または痰)、および / または、リスクファクターへ暴露された経歴なども考慮する。COPDを診断するために、または、COPDの様々な形態を区別するために、このような方法を用いると誤診を引き起こす恐れがある。それ故に、患者は、発症後直ちに、最も良い治療を受けることができない。

10

【0005】

それ故に、本発明の目的は、疾患の初期から、被験者において明確にCOPDを診断するための方法および手段、または、被験者がCOPDを患うリスクを決定するための方法および手段を提供することにある。

20

【0006】

本発明は、被験者が慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を患う危険性を診断するための方法であって、

被験者から試料を調製する工程と、

上記試料中のCD4 + CD28null T細胞の量を決定する工程と、

上記CD4 + 28null T細胞の量が、健康な被験者のCD4 + CD28null T細胞の量と比較して減少している場合に、COPDを患う危険性を診断する工程と、を有する方法、に関する。

30

【0007】

本発明の別の態様は、被験者の慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を診断するための方法であって、

被験者から試料を調製して、当該試料中のCD4 + CD28null T細胞の量を決定する工程と、

上記CD4 + 28null T細胞の量が、健康な被験者のCD4 + CD28null T細胞の量と比較して増加している場合に、COPDを診断する工程と、を有する方法、に関する。

【0008】

被験者のCD4 + CD28null細胞の量を決定することが、COPDの診断、特に、被験者におけるCOPDステージI / IIおよびIII / IVの診断を可能にするマーカーとして機能し得ることが判明した。上記マーカーは、被験者が将来COPDを患う危険性を決定することをも可能にする。生活様式が原因でCOPDを患う危険性があると考えられる全ての人 (例えば、煙草に曝されている人、喫煙者など) が、COPDを患うわけではない。それ故に、被験者がCOPDを患う危険性があるとする診断は、COPDを予防するために非常に有用である。更に、COPDを診断し、COPDステージI / IIとCOPDステージIII / IVとを区別することはまた、有用である。COPDの両方のステージを区別することは、異なる治療を行うために有用である。結果的にCD4 + CD28null T細胞を決定することは、治療の進行、または、疾患自体の進行を決定するためにも有用である。

40

50

## 【0009】

本発明の方法では、表面のCD28を有しないCD4 + CD28 null細胞が決定される。表面のCD28の量が減少しているCD4 + T細胞は、当該方法から除外される。更に、CD4 + CD28 null T細胞は、CD28を生産することができない、異なるタイプの細胞である。CD4 + CD28 + T細胞の一般的なCD28の量と比較して、単にCD28の量が減少している別のCD4 + T細胞は、上記規定に含まれない。Gadgil A.等は、そのようなCD4 + T細胞について記載している(Proc Am Thorac Soc 3 (2006): 487-488)。これらの細胞では、依然としてCD28を発現しているものの、CD28の発現が下方制御(down-regulated)されている。

## 【0010】

10

本発明の方法に用いられる上記マーカーは、単独で用いられることも可能であるし、あるいは、COPDを発症する危険性があるヒトのCOPDの診断に用いられている公知のあらゆる他のマーカーと共に用いられることも可能である。

## 【0011】

CD4は、ヘルパーT細胞および他の細胞(例えば、調節T細胞(regulatory T cell)、単球、マクロファージ、および、樹状細胞)の表面に発現する糖タンパク質である。CD28は、T細胞の活性化に必要な補助刺激シグナルを発するT細胞上に発現される分子の一つである。CD28は、B7.1(CD80)およびB7.2(CD86)のレセプターである。Toll様レセプターリガンドによって活性化された時、抗原提示細胞(APCs)において、B7.1の発現が上昇する。抗原提示細胞におけるB7.2の発現は、変化しない(constitutive)(P. Sansoni et al. Exp. Gerontology 43 (2008): 61-65. FA. Arosa. Immunol and Cell Biol. 80 (2002): 1-13)。

20

## 【0012】

複製にストレスが与えられた(replicatively stressed)CD4 + T細胞は、表現型および機能の多様な変化を生じる。最も広く知られている表現型の変化は、補助刺激表面マーカーであるCD28が消失することである。CD4 + T細胞の増加(expansion)およびCD28の消失は、恐らく老化(senescent)である。このことは、幾つかの自己免疫疾患(例えば、糖尿病、関節リウマチ、ヴェグナー肉芽腫症、多発性硬化症、および、強直性脊椎炎など)において記載されてきた。CD4 + CD28 null細胞は、クローンとして増加(clonally expanded)するとともに、自己反応性T細胞を含むことが知られており、自己免疫疾患において直接的な役割を担っていると考えられている。これらの増加したCD4 + クローンタイプは、典型的なヘルパーT細胞と、表現型の上で異なっている。CD28遺伝子の転写が阻害されているために、クローンとして増加したCD4 + T細胞は、表面上において、主要な補助刺激分子であるCD28の発現が欠損している。CD4 + CD28 null T細胞は、多量のインターフェロン-(IFN-)を放出するとともに、細胞内にパーフォリンおよびグランザイムBを含み、これらに対して、標的細胞を溶解させる能力を付与する。これらが、クローン化された巨大な集団へと増加すれば、特に、T細胞の増殖因子が無いときに生じるBcl-2の下方制御の欠損を引き起こす。CD28分子が無い場合、これらの例外的なCD4 + T細胞は、別の補助刺激経路を利用する。CD4 + CD28 - T細胞におけるこれらの機能的な特徴点の幾つかは、ナチュラルキラー(NK)細胞を連想させる。

30

40

## 【0013】

NK細胞と同様に、CD4 + CD28 - T細胞は、細胞傷害性であるとともに、NK細胞レセプター(例えば、CD94およびCD158)を発現し得る。NK細胞は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI分子と相互作用する多様なレセプターのファミリーによって厳密に制御されており、NK細胞によって媒介される細胞傷害やサイトカインの生産を制御するシグナルを生じる。MHCクラスIによって媒介されるNK細胞の全長レセプターの誘導によって、NK細胞の細胞溶解活性およびサイトカイン放出を抑制する、ドミナント阻害シグナル(dominant inhibitory signal)が発せられる。これらのレセプターはまた、短くなった細胞内ドメインを有するとともに活性化シグナルを伝達する

50

、高い相同性を有するメンバーを含んでいる。

【0014】

COPDの重症度を分類するために、スパイロメトリーによるパラメーターが用いられる。これらのパラメーターは、COPDの重症度を4つのステージに分類する(表A参照)。スパイロメトリーは、診断に必要であるとともに、COPDの病理変化の重症度に関する有用な説明を提供する。スパイロメトリーの特定の切点(cut-points)(例えば、気管支拡張薬後(post-bronchodilator)の $FEV_1 / FVC$ 比 $< 0.70$ 、または、 $FEV_1 < 80$ 、 $50$ または $30\%$ と予想される)が、COPDステージI~IVの決定に用いられる。

【0015】

表A：スパイロメトリーによるCOPDの分類(www.goldcopd.comによる)。気管支拡張薬後の $FEV_1$ に基づいた重症度。

【0016】

【化1】

ステージ I:軽度	$FEV_1/FVC < 0.70$ $FEV_1$ 80% 予想される
ステージ II:中程度	$FEV_1/FVC < 0.70$ $50\% FEV_1 < 80\%$ 予想される
ステージ III:重度	$FEV_1/FVC < 0.70$ $30\% FEV_1 < 50\%$ 予想される
ステージ IV:極めて重度	$FEV_1/FVC < 0.70$ $FEV_1 < 30\%$ 予想される または $FEV_1 < 50\%$ 予想されるとともに慢性的な呼吸不全を伴う

【0017】

$FEV_1$ ：1秒あたりの努力呼気肺活量； $FVC$ ：強制肺活量；呼吸不全：海拔ゼロ地点で呼吸を行っている間に、酸素( $PaO_2$ )の動脈血分圧が $8.0 kPa$ ( $60 mmHg$ )よりも低く、このとき、 $CO_2$ ( $PaCO_2$ )の動脈血分圧が $6.7 kPa$ ( $50 mmHg$ )よりも高くても高くなくてもよい。

【0018】

COPDを系統立てるために用いられ得る $FEV_1$ および $FVC$ (表A参照)を決定するための方法は、本技術分野において周知である(例えば、Eaton T, et al. Chest (1999) 116:416-23; Schermer TR, et al. Thorax (2003) 58:861-6; Bolton CE, et al. Respir Med (2005) 99:493-500参照)。

【0019】

個々の患者におけるCOPDの影響は、気流の制限の程度のみではなく、症状(特に、息切れ、および、運動能力の低下)の重症度にも依存する。気流の制限の程度と症状の間には、不完全な関連性しか存在しない。COPDに特徴的な症状は、慢性および進行性の呼吸困難、咳、並びに、痰である。慢性的な咳および痰は、何年もかけて、気流の制限へ発展し得る。この様式は、COPDの危険性を有する喫煙者およびその他を特定するため、および、疾患が未だ重篤な健康問題ではないときに介入するための特徴的な機会を提供する。

【0020】

逆に、重篤な気流の制限は、慢性的な咳および痰を伴うことなく発症し得る。COPDは気流の制限に基づいて規定されているが、実際の医療的な救済を求めるための決定およ

10

20

30

40

50

び、施されるべき診断の決定)は、通常、患者のライフスタイルにおける特有の症状の影響によって決定される。

【0021】

ステージ I : 軽度の COPD - 軽度の気流の制限 ( $FEV_1 / FVC < 0.70$ ;  $FEV_1 > 80\%$ と予測される)によって特徴付けられる。慢性的な咳および痰が生じ得るが、常時ではない。このステージでは、このステージでは、個人は、自身の肺機能が異常であることに通常気付かない。

【0022】

ステージ II : 中程度の COPD - 悪化した気流の制限 ( $FEV_1 / FVC < 0.70$ ;  $50\% < FEV_1 < 80\%$ と予測される)によって特徴付けられ、典型的に悪化した状態 (exertion) へ進行する息切れを伴う。時々、咳および痰を伴う。呼吸器の症状が慢性化する、または疾患が悪化するために、ステージ II では、典型的に患者が治療を求める。

10

【0023】

ステージ III : 重度の COPD - 更に悪化した気流の制限 ( $FEV_1 / FVC < 0.70$ ;  $30\% < FEV_1 < 50\%$ と予測される)、更なる息切れ、運動能力の低下、倦怠感、および繰り返される悪化によって特徴付けられ、これらはほとんど常に、患者のクオリティーオブライフに影響を及ぼす。

【0024】

ステージ IV : 極めて重度の COPD - 重度の気流の制限 ( $FEV_1 / FVC < 0.70$ ;  $FEV_1 < 30\%$ と予測される、または、 $FEV_1 < 50\%$ と予測される、それに加えて、慢性的な呼吸不全が存在する)によって特徴付けられる。呼吸不全は、海拔ゼロ地点で呼吸を行っている間に、 $O_2$  ( $PaO_2$ ) の動脈における分圧が  $8.0 kPa$  ( $60 mmHg$ ) 未満であると規定され、このとき同時に、 $CO_2$  ( $PaCO_2$ ) の動脈における分圧が  $6.7 kPa$  ( $50 mmHg$ ) よりも高くても高くなくてもよい。呼吸不全は、肺性心 (cor pulmonale) のような心臓にも影響を及ぼし得る (例えば、右心不全)。肺性心の臨床的徴候には、頸静脈圧の上昇、および足首の浮腫の形成が含まれる。たとえ  $FEV_1$  が  $30\%$  よりも高いと予測されたとしても、これらの症状が存在するときはいつでも、患者は、ステージ IV つまり極めて重度の COPD である。このステージでは、クオリティーオブライフが、非常に顕著に損なわれ、症状の悪化が、生命を脅かし得る。

20

30

【0025】

本明細書に用いられる用語「COPDを患う危険に曝される (at risk to develop COPD)」は、危険な環境に曝されている個人、または、COPDを患う遺伝性素因を有し得る個人の集団を意図する。COPDの形成に關与する要因には、遺伝性素因、煙草の煙のような粒子への曝露、職業的なほこり (有機または無機)、通気の悪い住居内でバイオマスを用いて暖房または調理を行うことによる屋内空気の汚染、屋外の大気汚染、肺の成長および発達、酸化ストレス、性別、年齢、呼吸器感染、社会的地位、栄養、ならびに、併存疾患が含まれる。COPDを患う危険に曝されているヒトは、慢性的な咳、慢性的な痰、および、通常のス파이ロメトリーに苦しめられる。しかしながら、これらの症状に苦しめられているヒトは、必ずしも、COPDステージ I へ進むわけではない。

40

【0026】

本明細書において用語「健康な被験者 (human subjects)」または「健康なヒト」は、COPD、または、あらゆる別の肺疾患を患っていないヒトを意図する。更に、これらの個人は、その生涯の中で、あらゆる重篤な肺疾患を患っていない。「健康なヒト」には、定期的に危険因子 (例えば、煙草、または、別の有害物質) に曝露されるヒトも含まない。

【0027】

本発明によれば、「健康なヒト」におけるマーカーの量は、少なくとも、5人、10人、15人または20人の「健康なヒト」における当該マーカーを定量することによって決定される。

50

## 【0028】

被験者の試料は、好ましくは、血液であり、更に好ましくは、ヘパリン添加血液である。

## 【0029】

CD4 + CD28 null 細胞の量を決定するために、好ましくは、抗CD4抗体および抗CD28抗体が用いられる。抗体を使用すれば、表面にCD4およびCD28のような抗原を発現している細胞を、特異的に検出したり、任意に定量したりすることができる。

## 【0030】

本明細書において用語「抗体」は、抗原に結合することが可能な、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはこれらの断片を意図する。別の抗体および抗体の断片（例えば、組み換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、FabまたはFv断片のような抗体の断片、ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって選択される断片、など）も、本明細書に記載された方法に用いることが可能である。

## 【0031】

ポリクローナル抗体と同様に、モノクローナル抗体を準備する方法は、よく確立されている (Harlow E. et al, 1988. Antibodies. New York: Cold Spring Harbour Laboratory)。ポリクローナル抗体は、標準的な免疫方法および採血方法を用いて、様々な種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ロバ、ラクダ、ウマなどを挙げる）が可能であるが、これらに限定されない）内で作製される。高力価の動物血液は、通常を選択的な塩析処置（例えば、硫酸アンモニウムを用いた沈殿法）によって分画される。そして、標準的な方法に従って、Protein-A-SepharoseカラムおよびLeptin-Sepharoseカラムを用いた連続したアフィニティークロマトグラフィーによって、特定の免疫グロブリン画分が得られる。精製されたポリクローナル抗体は、モノクローナル抗体と同様に、特異性が特定される。このような特徴付けは、トレーサーが付加されたタンパク質を用いる標準的な方法（例えば、抗体結合に拮抗する、非ラベル化された潜在的な交差反応物の増加する濃度と競合する、放射性同位体またはビオチン）によって行われる。更に、別の標準的な方法（例えば、還元条件下または非還元条件下における、よく確立されているドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)、および、ウエスタンブロット法）によって、結合試験が行われる。

## 【0032】

モノクローナル抗体は、よく確立された標準的な実験方法にしたがって作製することができる ("Practice and Theory of Enzyme Immunoassays" by P. Tijssen (in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Eds: R.H. Burdon and P.H. van Kinppenberg; Elsevier Publishers Biomedical Division, 1985))。当該実験方法は、KohlerおよびMilsteinの方法 (Kohler G., Milstein C. Nature 256:495, 1975) に基づいている。当該方法では、免疫された動物から脾臓細胞を取り出した後に、骨髄腫細胞と融合させるか、または、EBウイルス (Epstein-Barr virus) によって形質転換することによって、抗体生産細胞を不死化させる。その後、所望の抗体を発現しているクローンが、スクリーニングされる。当該分野において周知である他の方法を用いることも可能である。抗体はまた、当業者に周知である別の方法（例えば、特定のDNAを免疫する方法であるが、当該方法に限定されない）によっても作製され得る。

## 【0033】

CD4およびCD28へ特異的に結合する抗体は、好ましくは、フローサイトメトリーに用いられ、特に、蛍光細胞分析分離装置 (FACS) に用いられ、これによって、試料中のCD4 + CD28 null 細胞の量が決定される。上記抗体は、表面にCD4および/またはCD28を発現しているラベル化された細胞に対して用いられる。

## 【0034】

フローサイトメーター内のラベル化された細胞を検出するために、CD4およびCD28へ結合する上記抗体は、好ましくは、FITC、Alexa Fluor 488、G

10

20

30

40

50

FP、CFSE、CFDA-SE、DyLight 488、PE、PerCP、PE-Alexa Fluor 700、PE-Cy5 (TRI-COLOR)、PE-Cy5.5、PI、PE-Alexa Fluor 750、PE-Cy7、APC、または、APC-Cy7が付加されている。

【0035】

COPDを診断するため、または、COPDを患う危険性を診断するためには、それよりも高いまたは低ければ疾患を診断することができる基準点 (cut-off levels) を規定することが有利である。本発明の好ましい実施形態によれば、健康な被験者におけるCD4 + CD28nul1細胞の量は、全CD4 + 細胞の2.5%よりも低く、より好ましくは2.3%よりも低く、更には、1.7%よりも高く、より好ましくは1.8%よりも高い。全CD4 + 細胞に対するCD4 + CD28nul1細胞の量は、健康な被験者において、1.7% ~ 2.5%の範囲で変化する。

10

【0036】

全CD4 + T細胞の数は、周知の方法によって決定される。本発明の別の好ましい実施形態によれば、COPDを患う危険性は、健康なヒトのCD4 + CD28nul1細胞の量と比較して、試料内のCD4 + CD28nul1細胞の量が、少なくとも10%好ましくは少なくとも20%減少した場合に診断される。勿論、試料内のCD4 + CD28nul1細胞の量は、また、少なくとも15%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%にまで減少し得る。特に好ましい実施形態によれば、COPDを患う危険性があるヒトにおけるCD4 + CD28nul1 T細胞の量は、全CD4 + 細胞の数の0.8% ~ 1.6% (好ましくは、0.9% ~ 1.5%、および、1% ~ 1.4%) である。

20

【0037】

更に好ましい実施形態によれば、COPDを患っているヒトにおけるCD4 + CD28nul1 T細胞の量は、全CD4 + 細胞の2.7%よりも多く、好ましくは2.8%よりも多く、更に好ましくは3%よりも多い。

【0038】

本発明の方法は、他の生物 (例えば、ウマ、イヌ、ネコ、またはウシ) へも適用し得る。

【0039】

本発明の別の態様は、被験者におけるCOPDステージI / IIIとCOPDステージIII / IVとを区別するための方法であって、

- COPDを患っている被験者から試料を調製する工程と、
- 上記試料中のCD4 + CD28nul1細胞の量を決定する工程と、
- 上記CD4 + CD28nul1細胞の量が、COPDステージIII / IVを患っている被験者に由来する試料中のCD4 + CD28nul1細胞の量と比較して減少している場合に、COPDステージI / IIが診断される工程、または、上記CD4 + CD28nul1細胞の量が、COPDステージI / IIを患っている被験者に由来する試料中のCD4 + CD28nul1細胞の量と比較して増加している場合に、COPDステージIII / IVが診断される工程と、を有する方法に関する。

30

40

【0040】

本明細書に開示されているCOPDマーカーは、既に規定したCOPDステージI / IIを患っている被験者と、COPDステージIII / IVを患っている被験者とを区別することにも適している。これらのCOPDステージを区別することは、治療法を決定する上で重要である。例えば、幾つかの症状または断続的な症状 (ステージIおよびII) を示している患者では、短時間で作用する吸入用の気管支拡張薬を用いれば、十分に呼吸困難を制御できる。吸入用の気管支拡張が利用できない場合には、徐放性のテオフィリンを用いた通常の処置を施すことを考慮すべきである。短時間で作用する気管支拡張薬によって必要に応じて処置したにもかかわらず、日々の活動時の呼吸困難が緩和されないヒトに関しては、長期間効果がある吸入用の気管支拡張薬による通常の処置を施す必要がある。

50

COPDステージIII/IVを患っているヒトでは、吸入用のグルココルチコステロイド (glucocorticosteroids) を用いた通常の処置によって、症状の悪化の程度が減少するとともに、健康状態が改善する。これらのヒトでは、吸入用のグルココルチコステロイドを用いた通常の処置が、長期間効果がある吸入用の気管支拡張薬に加えらるべきである。COPDステージIII/IVを患っているヒトにおいて、慢性的な呼吸不全が生じる場合には、外科治療および/または長期間の酸素処置 (long term oxygen) を施すことを検討すべきである。

【0041】

COPDステージI/IIとCOPDステージIII/IVとを区別することができる基準値は、COPDステージI/IIおよびCOPDステージIII/IVを各々患っているヒトから得られた試料のプール (pool) の中のCD4 + CD28null細胞の量を決定することによって、見積もられ得る。このようなプールは、少なくとも5人、好ましくは少なくとも10人、より好ましくは少なくとも20人のCOPDを患っているヒトであって、別の方法 (例えば、スパイロメトリー) によって様々なCOPDステージが診断されているヒトから得られる試料を含み得る。上述したように、全CD4 + 細胞に対するCD4 + CD28null T細胞の量は、被験者において、1.7% ~ 2.5%の範囲で変化し得る。COPDを患う危険性があるヒトは、全CD4 + T細胞の0.8% ~ 1.6%のCD4 + CD28null T細胞を含む。COPDステージI/IIを患っているヒトは、全CD4 + T細胞の2.7% ~ 4.5% (好ましくは、2.8% ~ 4.3%) のCD4 + CD28null T細胞を含む。COPDステージIII/IVを患っているヒトは、全CD4 + T細胞の5% ~ 12% (好ましくは、6% ~ 10%) のCD4 + CD28null T細胞を含む。

10

20

【0042】

本発明の別の実施形態では、COPDステージI/IIは、INF- $\gamma$  の量を決定することによって、COPDステージIII/IVと区別され得る。

【0043】

本発明の更なる態様は、被験者における慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の進行を観察するための方法であって、

- 被験者から試料を調製する工程と、
- 上記試料中のCD4 + CD28null細胞の量を決定する工程と、
- 上記被験者の上記試料中の上記CD4 + CD28null細胞の量と上記被験者の以前の試料中のCD4 + CD28null細胞の量とを比較する工程と、を有する方法、に関する。

30

【0044】

本明細書中に開示されているマーカーは、COPDの進行、およびCOPDの治療の進行を観察するためにも用いられ得る。このような方法は、異なる時間間隔でヒトから採取した試料中のCD4 + CD28null細胞の量を比較することを包含する。上記方法によって得られた結果は、医者が適切な治療を設定することを可能にする。

【0045】

以下の図面および実施例によって本発明を更に説明するが、本発明は、これらに限定されない。

40

【0046】

図1は、末梢血流中のCD4 + CD28null細胞の割合を示している。結果は、mean + / - SEMにて示されている。

【0047】

図2は、補助刺激CD28 (co-stimulatory CD28) を有しておらず、細胞内の細胞溶解性タンパク質であるパーフォリン (a) およびグランザイムB (b) が抑制されている、CD4 + T細胞の部分集合を示している。結果は、mean + / - SEMにて示されている。

【0048】

50

図3は、NK細胞レセプターであるCD94およびCD158の細胞表面における発現が著しく増加したCD4/CD28null細胞を示している。結果は、mean + / - SEMにて示されている。

【0049】

図4は、CD4+におけるCD4+CD28nullの割合(%)と、FEV1%、MEF50%、または、MEF25%との関係を示すスキャッチャープロット(scatterplots)を示している。スピアマンの相関係数(Spearman's correlation coefficients)およびp値(p-values)が得られる。

【0050】

図5は、CD4+CD28nullの割合の測定結果に基づいた、喫煙者の部分集合においてCOPDを予測するためのROC曲線を示している。

10

【0051】

〔実施例〕

〔実施例1〕

〔材料および方法〕

〔患者〕

少なくとも40歳である合計64人のボランティアが、この試験に参加した。健康な非喫煙者(n=15)、健康な喫煙者(n=14)、GOLD診断基準でCOPD IおよびIIと判定される喫煙者(n=19)、および、GOLD診断基準でCOPD IIIおよびIVと判定される喫煙者(n=16)23が、募集された。試験開始前14日以内に、WHOおよびGlobal Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) (Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. Global Initiative FOR Chronic Obstructive Lung Disease, 2007, www.goldcopd.com)のガイドラインによって急性増悪期(acute exacerbation)であると判定されたCOPDの患者は、除外された。喘息、自己免疫疾患、または、他の関連した肺疾患(例えば、肺癌、周知のa1-抗トリプシン欠乏症)を患った経験がある者も、除外された。更に、全ての患者は、周知の冠動脈疾患、末梢動脈障害および頸動脈疾患を患っていない者であった。身長および体重(Seca; Vogel and Halke, Germany)が測定され、肥満度指数(BMI)が決定された。同じ型のスパイロメーター(AutoboxV6200, SensorMedics, Austria)を用いて、肺機能(FEV1、FVC、およびFEV1/FVC比率)が測定された。気道閉塞の基準に合致した場合には、200μgのサルブタモールを吸入する前、および、吸入して15分~30分後に、測定を行った。室内の空気を呼吸しながら座って安静している状態で、動脈血ガス(PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>)が得られた。動脈血ガスの測定は、ABL 510 gas analyzer (Radiometer, Denmark)を用いて行った。European Community for Steel and Coal prediction equations (Quanje PH et al. Eur Respir J Suppl 16 (1993): 5-40)に従って、絶対値として、並びに、年齢、性別および身長に基づく予測値の割合として、結果を示した。通常の予測値は、Austrian Society of Pulmonary Medicine (Hannoncourt K et al. Osterreich. Arzttg. 37 (1982): 1640-1642)の基準値に由来するものであった。

20

30

【0052】

〔フローサイトメトリ解析〕

ヘパリン添加血液試料を、蛍光色素によって標識された抗体と共に、氷上にてインキュベートした。抗体のインキュベーションに先立って、BD FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, Becton Drive, Franklin Lakes, New Jersey, USA)を加えることによって、赤血球を溶解した。次いで、FITCを結合した抗CD4 (BD Biosciences Pharmingen, USA)、PEにて標識した抗CD158 (R&D Systems, USA)、PE-Cy5にて標識した抗CD28 (Biolegend, USA)、および、PEを結合した抗CD94 (eBioscience, USA)の様々な組み合わせを用いて、細胞を染色した。染色された細胞を、Cytomic FC 500 フローサイトメーター(Beckman Coulter, USA)を用いて解析した。細胞内の染色には、PEを結合した抗パーフォリン抗体および

40

50

抗グランザイム B 抗体 (BD Biosciences Pharmingen, USA; Serotec, Germany) を用い、サポニン溶液を用いて細胞膜の透過化 (permeabilization) を行った後で、これらの抗体と前染色された細胞とをインキュベートした。

【 0 0 5 3 】

〔 酵素免疫測定法 ( E L I S A ) 〕

全血を遠心分離処理した後で得られる血清試料中の I L - 1 、 T N F - 、 I F N - および I L - 1 0 を定量するために、 E L I S A 法 ( BenderMedSystems, Austria) を用いた。

【 0 0 5 4 】

特定の抗原を認識するモノクローナル抗体を用いて 9 6 穴プレートにコーティングし、4 にて朝までインキュベートした。洗浄した後、アッセイ用のバッファを用いて、2 時間、プレートをブロッキング (blocked) した。更に洗浄した後、試料と、抗原の濃度が規定されている基準物質 (standards) とを、製造者 (manufacturer) が記載しているようにインキュベートした。次いで、プレートを洗浄するとともに、酵素が結合したポリクローナル抗体を用いてインキュベートした。適切な回数のインキュベーションおよび更なる洗浄の後、T M B 基質溶液を加えた。次いで、W a l l a c M u l t i l a b e l c o u n t e r 1 4 2 0 (PerkinElmer, USA) を用いて、発色を観察した。得られた光学濃度 (O . D .) の値を、既知の濃度の抗原を用いて作製した基準物の O . D . 値から算出された標準曲線と比較した。

10

【 0 0 5 5 】

〔 新鮮に調製された末梢血単核細胞の刺激 〕

新鮮に調製された末梢血単核細胞 (P B M C s) を、標準的なフィコール密度勾配遠心分離法によって分離した。次いで、P B S 中で細胞を 2 回洗浄し、当該細胞の数を数えた。そして、当該細胞を、9 6 穴の平底プレートへ、1 つの穴あたり、 $1 \times 10^5$  細胞 /  $200 \mu\text{L}$  の無血清の U l t r a C u l t u r e M e d i u m (Cambrex Corp., USA) 、となるように移した。なお、上記 U l t r a C u l t u r e M e d i u m は、0 . 2 % のゲンタマイシン硫酸塩 (Sigma, USA) 、0 . 5 % の  $\beta$ -メルカプト-エタノール (Sigma, USA) 、および 1 % の L - グルタミン (Sigma, USA) を含んでいる。抗 C D 3 (C D 3) ( $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) またはフィトヘムアグルチニン (P H A) ( $7 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) を加えた後、当該プレートを、1 8 時間、加湿された雰囲気下 (5 %  $\text{CO}_2$ 、37 ) へ移した。上清を採取して、- 2 0 にて保存した。

20

30

【 0 0 5 6 】

〔 上清中の I F N - 、 T N F - および I L - 1 2 の定量 〕

上述したように、刺激された細胞の上清中の I F N - 、 T N F - および I L - 1 2 の定量は、E L I S A 法 ( BenderMedSystems, Austria) を用いて行った。

【 0 0 5 7 】

〔 統計学的方法 〕

母数によらないウイルコクソン検定 (non-parametric Wilcoxon tests) を用いて、健康な非喫煙者、健康な喫煙者、C O P D I および I I の患者、並びに、C O P D I I および I V の患者の間で、主要な評価項目である C D 4 + における C D 4 + C D 2 8 n u l l の割合に関する二つ一組の比較を行った。複数の試験 (6 つのグループの比較) を調整するために、更に、6 つの比較の間のファミリーワイズエラーレート (family wise error rate) を制御するための、母数によらない N e m e n y i - D a m i c o - W o l f e - D u n n (N D W A) 試験を行った (新しい R パッケージにおける、機能の一方回試験 (function one-way-test in the coin R-package))。各群において、平均の C D 4 + C D 2 8 n u l l の割合に関する、パラメーター 9 5 % 信頼区間を算出した。e x v i v o の C D 3 および P H A において、I N F - 、 T N F - および I L - 1 2 についてグループ間で比較するために、N D W D 試験を用いた多重度解析 (the multiplicity adjusted analysis with the NDWD-test) が報告される。スピアマンの相関係数 (spearman's correlation coefficient) を用いて、血清のサイトカイン濃度と肺機能のパラメ

40

50

ーターとの相関関係を算出した。

【0058】

スピアマンの相関係数を用いて、CD4 + CD28nul1細胞の割合と、肺活量のFEV1%、MEF50%の予測値、およびMEF25%の予測値との相関関係を見積もった。ウイルコクソンの符号付き検定 (Wilcoxon Signed Rank tests) を用いて、CD4 + CD28nul1細胞とCD4 + CD28 + 細胞との間で、パーフォリン、グランザイムBの流行率 (prevalence) およびCD94、CD158の発現を比較した。更に、各変数の平均率のパラメーター95%信頼区間 (parametric 95% confidence intervals) が与えられる。

【0059】

喫煙者の部分集合において、変数COPD (yes / no) に依存するとともに変数CD4CD28nul1%に依存せずに、ロジスティック回帰を行った。異常値を明らかにするために、当該解析では、上記割合の平方根 (square root) を用いた。CD4CD28nul1の割合の予測能力 (predictive capacity) を評価するために、そのAUCを用いて、ROC曲線を算出した。

【0060】

〔結果〕

〔試験された患者の人口統計学上の特徴〕

患者の人口統計学上の特徴を表1および2に示す。健康な非喫煙者、健康な喫煙者、GOLDで分類されたCOPD IおよびII、GOLDで分類されたCOPD IIIおよびIVが含まれる。全てのグループにおいて、類似した数の患者が含まれており、年齢および性別も同様に分布している。

【0061】

表1：臨床上的の特徴点 (気道閉塞の重症度は、肺機能試験 (LFT) を用いて、全ての被験者について決定された；COPDの患者は、GOLDによるCOPDの診断基準に合った患者であった)。データは、言及しない限り、平均値 (mean) にて示されている。

【0062】

10

20

【表 1】

検査項目	健常者	健康な喫煙者	COPD GOLD I-IV	COPD GOLD I&II	COPD GOLD III&IV
n	15	14	35	19	16
男性/女性	10/5	7/7	20/15	10/9	10/6
年齢	57.20	56.64	59.60	60.68	58.31
(SD)	12.50	9.17	8.01	7.39	8.75
肺機能試験		-			
FVC (L)	4.55	3.84	2.80	3.33	2.14
(SD)	0.94	0.66	1.08	1.06	0.70
FEV1 (%)	105.37	94.40	52.76	70.21	30.67
(SD)	17.11	11.96	23.71	13.33	12.66
FEV1/VC (%)	76.80	75.95	51.18	61.74	37.80
(SD)	7.85	3.99	16.83	8.36	15.33
MEF 50 (%)	100.67	87.64	27.29	39.42	11.93
(SD)	28.92	21.45	18.68	15.93	6.60
MEF 25 (%)	103.53	75.71	29.71	37.37	20.00
(SD)	33.89	31.33	15.31	16.19	5.94

10

20

30

## 【0063】

(略記: COPD - Chronic Obstructive Pulmonary Disease; FVC - Forced Vital Capacity; FEV1 - 1秒あたりの努力呼気肺活量 (Forced Expiratory Volume in 1 second); MEF = Maximal Expiratory Flow; SD - Standard Deviation)

## 【0064】

表2: 全ての被験者に関する臨床上的の特徴点および喫煙状況。データは、言及しない限り、平均値 (mean) にて示されている。(SD - standard deviation)

## 【0065】

【表 2】

検査項目	健常者	健康な喫煙者	COPD GOLD I-IV	COPD GOLD I-II	COPD GOLD III-IV
喫煙の経歴					
非喫煙者 (n)	15	0	0	0	0
以前の喫煙者 (n)	0	3	7	4	3
現在の喫煙者 (n)	0	11	28	15	13
パッケイヤー (Pack Years)	0	34	45.8	47.3	44.0
(SD)	0	25.2	30.6	29.7	32.6
体重 (kg)	71.6	76.4	80.4	79.7	81.1
(SD)	13.9	8.6	21.6	16.7	27.2
身長 (cm)	172.7	168.7	169.2	167.7	171.2
(SD)	10.9	8.1	10.5	12.1	7.9

10

20

## 【0066】

〔CD4 + CD28nul1細胞は、COPDを患っている患者において増加する〕

慢性閉塞性肺疾患を患っている患者にてCD4 + CD28nul1細胞が増加しているか否かを試験するために、多重染色フローサイトメトリーを用いて血液試料を検査した。図1および表4は、全CD4 + 細胞中のCD4 + CD28nul1細胞の割合を示している。COPD IIIおよびIVのグループは、健康な非喫煙者および健康な喫煙者のグループと比較して、著しく数値が上昇していた (Wilcoxon test:  $p=0.012$ ,  $p=0.002$ )。加えて、COPD IおよびIIのグループと健康な喫煙者のグループとの間に、著しい差異が観察された (Wilcoxon test:  $p=0.046$ )。多重度を修正した後では (after correcting for multiplicity)、COPD IIIおよびIVのグループと健康なグループとの間の差異のみが著しい。

30

## 【0067】

〔刺激されていないCD4 + CD28nul1細胞は、細胞溶解性タンパク質であるパーフォリンおよびグランザイムBを含む〕

CD4 + 細胞内における、細胞溶解性タンパク質であるパーフォリンおよびグランザイムBの細胞質内の含有量 (intra-cytoplasmic content) を調べるために、サポニン溶液と共にインキュベートして細胞内を染色した後で、フローサイトメトリーにて血液試料を解析した。パーフォリンの含有量は、CD4 + CD28 + 細胞と比較して、CD4 + CD28nul1細胞において、より優勢であった。図2(a)。(46.13% [39.34 - 52.91] 対 4.68% [3.04 - 6.32],  $p < 0.001$ ; 全、平均値 (mean) [95% CI]) CD4 + CD28nul1細胞の細胞内におけるグランザイムBの陽性染色 (positive staining) は、CD4 + CD28 + 細胞よりも、頻度が高かった。図2(b)。(78.63% [72.65 - 84.61] 対 2.36% [1.63 - 3.11],  $p < 0.001$ ; 全、平均値 (mean) [95% CI])。

40

## 【0068】

〔CD4 + CD28nul1細胞上における、ナチュラルキラー細胞レセプターの増加〕

CD4 + 細胞の表面上のCD94およびCD158の発現を評価するために、フローサ

50

イトメトリ解析を行った。図3(a)~図3(b)は、CD4+CD28null細胞における、表面抗原であるCD94およびCD158の発現の増加を示している。(CD94、10.00% [6.04 - 13.97] 対 1.41% [0.85 - 1.97]、 $p < 0.001$ ; CD158、9.35% [6.22 - 12.47] 対 2.00% [1.61 - 2.39]、 $p < 0.001$ ; 全、平均値 (mean) [95% CI])。

【0069】

〔スパイロメトリーの通常のパラメーターと負に相関する (correlates negatively) CD4+CD28null細胞の割合〕

我々のフローサイトメトリーのデータと通常臨床データとを照合するために、CD4+CD28nullの割合を、肺活量のFEV1、MEF50%の予測値、および、MEF25%の予測値と関連付けた。全てのパラメーターが、CD4+CD28null細胞の割合と、統計学的に極めて負の相関を示した。(スピアマンの相関係数: FEV1%、 $R = -0.49$ 、 $p < 0.001$ ; MEF50%、 $R = -0.40$ 、 $p = 0.001$ ; MEF25%、 $-0.38$ 、 $p = 0.002$ )。図4(a)~図4(c)。

10

【0070】

〔喫煙者のCOPDにおけるCD4+CD28null細胞の割合の予測能力 (Prediction Capacity)〕

喫煙者の部分集合に対するロジスティック回帰分析において、CD4+CD28null細胞の独立変動率 (independent variable percent) は、COPDと非常に関連があることを示した ( $p = 0.012$ )。対応するROC曲線 (図5) は、 $AUC = 0.76$ の曲線の下側に領域 (area) を有している。

20

【0071】

〔血清のサイトカイン濃度 (IL-1、TNF-、IFN- およびIL-10) と、FEV1%、MEF50%、MEF25%との相関〕

表3は、血清サイトカインであるIL-1、TNF-、IFN- およびIL-10と、通常肺機能パラメーターとの、母数によらない相関関係を示している。

【0072】

表3: 血清サイトカイン濃度と肺機能試験のパラメーターとの相関。係数 (coefficients) およびp値 (p-values) は、本実施例に加わった全ての患者について算出された。

【0073】

30

【表 3】

相関関係	係数	p 値
IFN- $\gamma$ - FEV1%	0.538	<0.001
IFN- $\gamma$ - MEF50%	0.556	<0.001
IFN- $\gamma$ - MEF25%	0.489	<0.001
TNF- $\alpha$ - FEV1%	0.334	0.008
TNF- $\alpha$ - MEF50%	0.337	0.007
TNF- $\alpha$ - MEF25%	0.309	0.014
IL-1 $\beta$ - FEV1%	0.291	0.022
IL-1 $\beta$ - MEF50%	0.284	0.026
IL-1 $\beta$ - MEF25%	0.267	0.036
IL-10 - FEV1%	0.325	0.01
IL-10 - MEF50%	0.328	0.009
IL-10 - MEF25%	0.300	0.018

10

20

## 【0074】

〔COPDの初期のステージを患っている患者の刺激を受けたPBMCsは、*ex vivo*において、増加した量のIFN- およびTNF- を生産する〕

末梢血単核細胞の機能的な活性を調べるために、リンパ球特異的な抗CD3およびフィトヘムアグルチニン (phytohemagglutinin) を用いて、プラストジェネシス アッセイ (blastogenesis assay) を行った。当該アッセイは、5人の患者のみが含まれるCOPD I I IおよびI Vを除いて、1グループについて7人の患者に対して行った。表4に、グループ平均値 (Groupwise mean) および95%信頼区間を示す。

## 【0075】

30

表4：表4は、末梢血流中のCD4+CD28null細胞の割合を示している。更に、抗CD3またはPHAによる刺激を受けたPBMCの上清中のサイトカインの発現が示されている。全てのデータは、平均値として記載されている。

## 【0076】

【表 4】

検査項目	健常者	健康な喫煙者	COPD GOLD I&II	COPD GOLD III&IV
CD4+ における CD4+CD28null の割合 (%)	1.96	1.5	3.22	7.53
IFN- $\gamma$ CD3 pg/mL	272	240	440	328
IFN- $\gamma$ PHA pg/mL	116	91	375	134
TNF- $\alpha$ CD3 pg/mL	922	731	1234	1508
TNF- $\alpha$ PHA pg/mL	1096	777	2465	1144
IL-12 CD3 pg/mL	93	63	72	42
IL-12 PHA pg/mL	44	33	78	17

10

20

## 【0077】

COPD I および II を患っている患者の上清では、健康な喫煙者と比較して、IFN- $\gamma$  の濃度が著しく増加しており (NDWD 試験: CD3:  $p = 0.049$ ; PHA:  $p = 0.062$ ); 健康なグループにおける濃度、ならびに、COPD III および IV を患っている患者のグループにおける濃度は、COPD I および II を患っている患者のグループと比較して、低いものの、顕著な相違はなかった。残りの二つ一組の比較中には、統計的に有意なものはなかった。

## 【0078】

COPD I および II のグループは、健康な喫煙者 (NDWD 試験:  $p = 0.001$ ) および非喫煙者 (NDWD 試験:  $p = 0.047$ ) と比較して、TNF- $\alpha$  (PHA) の濃度が著しく上昇しており、COPD III および IV の患者 (NDWD 試験:  $P = 0.054$ ) と比較して、濃度がわずかに上昇していた。残りの二つ一組の比較中には、統計的に有意なものはなかった。TNF- $\alpha$  (CD3) については、グループ間に顕著な差異は観察されなかった。IL-12 (PHA) については、他のグループと比較して、COPD I および II のグループにおいて、より濃度が高かった。しかしながら、COPD III および IV のグループに対する差異のみが、統計的に有意であった。IL-12 (CD3) の濃度は、グループ間の相違において有意ではなかった。

30

## 【0079】

## 〔結論〕

血液中を循環しているリンパ球およびそれらの部分集合の全数は、厳密なホメオスタティックコントロール (homeostatic control) の下にある。この実施例は、COPD を患っている患者が、機能的に異なる、および表現型の上で異なる CD4+ T 細胞の部分集合の存在に重大な変化を有していることを示した。補助刺激 CD28 を有していないこと、および、細胞溶解性タンパク質であるグランザイム B およびパーフォリンを細胞内に蓄えていることによって特徴付けられる CD4+ T 細胞クローンは、たとえ喫煙を止めた後であっても、COPD 患者における継続した組織の炎症状態の原因になり得る。CD4+CD28null クローンタイプによって他の CD4+ T 細胞が置き換えられる基本的なメカニズムは、完全には理解されていない。しかしながら、CD4+CD28n

40

50

u l l T細胞の表現型の解析および機能解析は、これらが、NK細胞と関係しており、NK様T細胞26 (NK-like T-cells 26)の集団を形成することを示している。CD4 + CD28 null T細胞が、IgスーパーファミリーであるMHCクラスI認識レセプター (CD94、CD158)を発現することが見出された。本データは、CD4 + CD28 null T細胞が、NK細胞と多数の特徴点を共有しており、CD4 + CD28 null T細胞が、先天性免疫の機能特性と適応免疫の機能特性とを兼ね備え得ることを裏付けている。

#### 【0080】

関連する免疫機能を検証するために、試験されたグループの末梢血単核細胞 (PBMC) を分離して、当該細胞を、*in vitro*にて、特異的および非特異的なT細胞刺激によって活性化した。COPD GOLD IおよびIIに由来する組織の白血球では、対照と比較して、マクロファージおよび樹状細胞の活性を増加させることが知られているサイトカインであるIFN- $\gamma$  およびTNF- $\alpha$  の分泌量が増加することが証明され得る。この観察結果は特に興味深い。というのも、*in vitro*におけるこの現象は、疾患の進行における初期のステージ (GOLDステージIおよびII)にある患者でのみ観察され、このことは、NK様T細胞が、初期の肺組織破壊の誘発に特定の役割を果たしていることを示している。*in vitro*における当該発見は、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  およびIL10の血中濃度が、最近悪化していないCOPD患者において上昇しているか否か検討することを可能にする。しかしながら、これらのタンパク質は、スパイロメトリーのパラメーターの悪化に伴って増加するわけではない。それ故に、組織のCD4 + CD28 null T細胞クローンの存在がCOPDの診断に関係があるか、検討された。ロジスティック回帰分析が行われ、当該ロジスティック回帰分析は、組織のCD4 + CD28 null T細胞の存在によって、高い確率でCOPDを診断できることを可能にした。

#### 【0081】

どんな競合機構がCOPDの原因であろうとも、COPDにおける組織の慢性炎症の存在は、様々な共存する病的状態 (co-morbidities) (例えば、悪液質、骨粗鬆症、および心疾患)と関連している。COPDを患っている患者の半分よりも多い人が心臓血管が原因で死亡することから、COPDと心疾患とは、とりわけ密接に関連している。不安定狭心症 (UA)を患っている患者が、安定狭心症 (SA)を患っている患者と比較して、増加したIFN- $\gamma$  生産に対するバイアス (bias)を有する、機能的なT細胞のレパートリー (CD4 + CD28 null)の不安定性 (perturbation)によって特徴付けられることも、優れた試験によって示されている。CD4 + CD28 null細胞が、UAを患っている患者の血液中、および、不安定なプラークを含む冠状動脈に由来する抽出物中に見出されるという事実は、UAにおいて循環しているCD28欠損CD4 +細胞の増加が、組織の炎症の維持のみならず、アテローム性動脈硬化症および組織の変性において病理的役割を果たしていることを示唆している (恐らくは、プロ炎症性サイトカインを高濃度に合成することによる)。興味深いことに、このことに直接関連して、関節リウマチ (RA)を患っている患者では、臨床前のアテローム硬化性の変化 (動脈内皮機能不全および頸動脈壁肥厚を含む)に直接関与する、循環しているCD4 + CD28 null T細胞が増加していることが見出されている。T細胞のプール (pool)の不安定性の観察は、COPDにおいて以前から観察されている長期間の心血管系の危険 (long-term cardiovascular risk)の説明に関係があるかもしれない。

#### 【0082】

慢性的な抗原への露出 (例えば、煙草の煙の含有物を介する)は、潜在的に遺伝的に影響を受け易い患者のT細胞において、CD28を消失させるとともに、NK細胞レセプターの発現を上させる。当該誘導された免疫の老化 (immunological senescence)は、Bcl-2のようなシグナルによって誘導されるアポトーシスの制御異常を伴い、細胞傷害性のT細胞が長生きすることが助長されるとともに、*in vitro*においてT細胞が誘発するIFN- $\gamma$  およびTNF- $\alpha$  の分泌が増加される。しかしながら、何故に、*in*

*in vitro*におけるINF- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ 生産の増加が、T細胞特異的な誘発後に、COPD IおよびIIにおいてのみ明らかになったのかは明らかではないままである。これらのデータから、何故にCOPD患者における喫煙の中止が、肺組織における炎症プロセスに基づく進行性細胞 (progressive cell) を完全には減少できないのか、明らかであると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】末梢血流中のCD4+CD28null細胞の割合を示している。

【図2a】補助刺激CD28 (co-stimulatory CD28) を有しておらず、細胞内の細胞溶解性タンパク質であるパーフォリンが抑制されている、CD4+ T細胞の部分集合を示している。 10

【図2b】補助刺激CD28 (co-stimulatory CD28) を有しておらず、細胞内の細胞溶解性タンパク質であるグランザイムBが抑制されている、CD4+ T細胞の部分集合を示している。

【図3a】NK細胞レセプターであるCD94の細胞表面における発現が著しく増加したCD4/CD28null細胞を示している。

【図3b】NK細胞レセプターであるCD158の細胞表面における発現が著しく増加したCD4/CD28null細胞を示している。

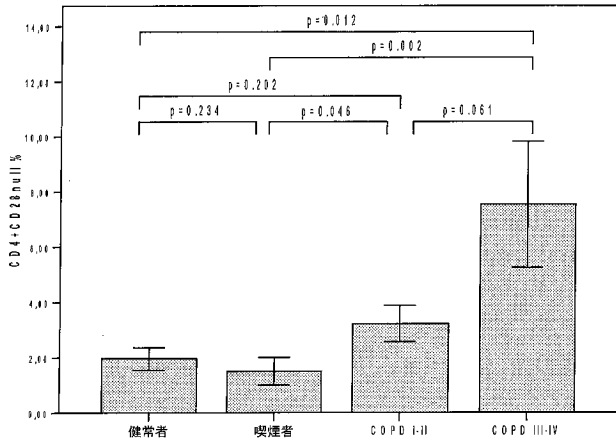
【図4a】CD4+におけるCD4+CD28nullの割合(%)と、FEV1%との関係を示すスキャッチャープロット (scatterplots) を示している。 20

【図4b】CD4+におけるCD4+CD28nullの割合(%)と、MEF50%との関係を示すスキャッチャープロット (scatterplots) を示している。

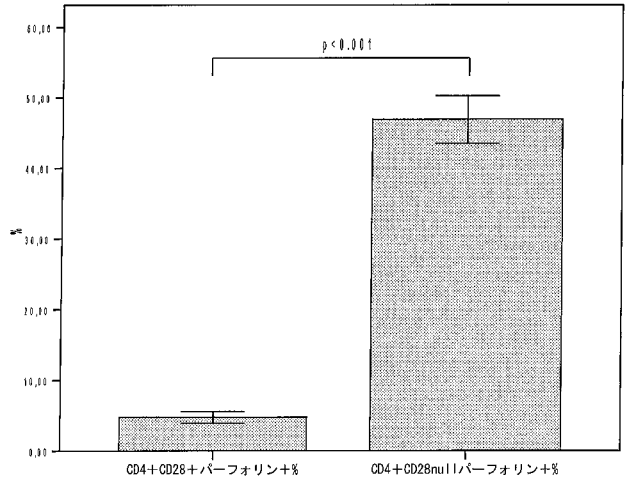
【図4c】CD4+におけるCD4+CD28nullの割合(%)と、MEF25%との関係を示すスキャッチャープロット (scatterplots) を示している。

【図5】図5は、CD4+CD28nullの割合の測定結果に基づいた、喫煙者の部分集合においてCOPDを予測するためのROC曲線を示している。

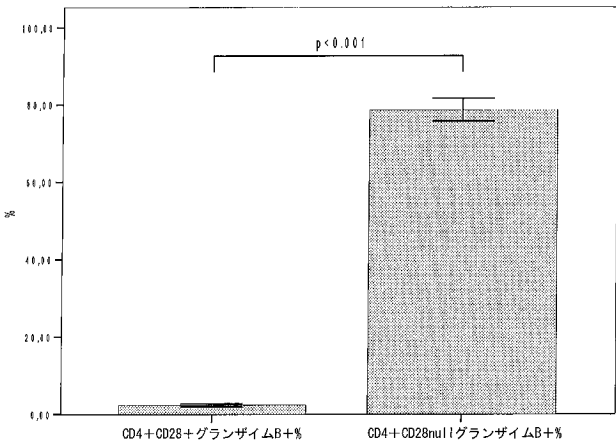
【 図 1 】



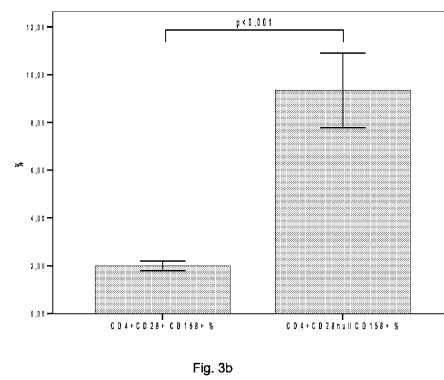
【 図 2 a 】



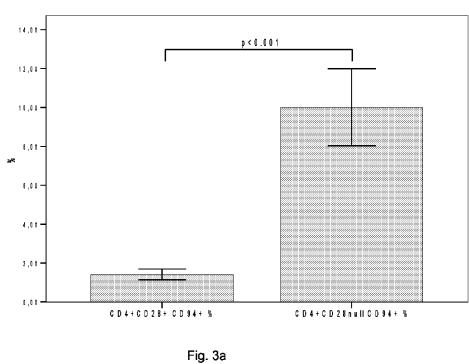
【 図 2 b 】



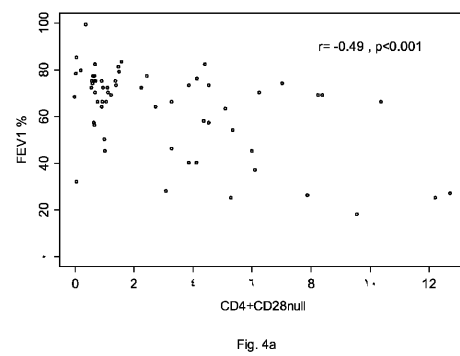
【 図 3 b 】



【 図 3 a 】



【 図 4 a 】



【 図 4 b 】

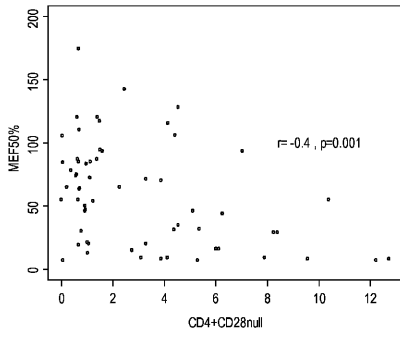


Fig. 4b

【 図 4 c 】

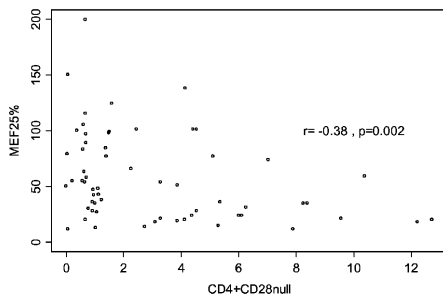
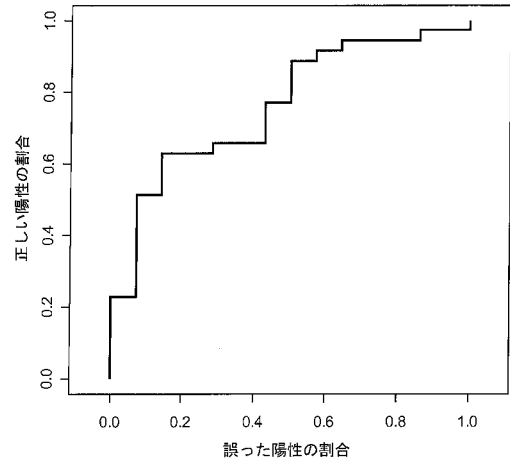


Fig. 4c

【 図 5 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2009/058354
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/569		
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		
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, 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.
Y	WO 2006/105252 A (UNIV COLORADO [US]; GERACI MARK W [US]; COLDREN CHRISTOPHER D [US]; GR) 5 October 2006 (2006-10-05) claim 1	1-13
Y	LETHBRIDGE M.W. ET AL: "Increased activation of T cells grown from endobronchial tissue of COPD current smokers" FOURTH ERS ANNUAL CONGRESS, September 2006 (2006-09), page 552S, XP002500720 Munich abstract P3183 abstract; table 1	1-9
-/--		
<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 doubt 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
28 September 2009		08/10/2009
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  Wiesner, Martina

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/058354

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SULLIVAN ANDREW K ET AL: "Oligoclonal CD4(+) T cells in the lungs of patients with severe emphysema" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 172, no. 5, September 2005 (2005-09), pages 590-596, XP002500721 ISSN: 1073-449X page 592, paragraph 1	2-9
Y	MARC M M ET AL: "Lung tissue and tumour-infiltrating T lymphocytes in patients with non-small cell lung carcinoma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): moderate/severe versus mild stage of COPD." SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY DEC 2007, Vol. 66, no. 6, December 2007 (2007-12), pages 694-702, XP002547718 ISSN: 1365-3083 table 2	10-13
A	BARCELÓ B ET AL: "Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking" EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK, vol. 31, no. 3, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 555-562, XP008097725 ISSN: 0903-1936 page 557, left-hand column, paragraph 3; table 4	1-13
A	US 2008/044843 A1 (PERLEE LORAH [US] ET AL) 21 February 2008 (2008-02-21) claim 1	1-13
A	EKBERG-JANSSON A ET AL: "The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and never-smoking men, 60 years old" RESPIRATORY MEDICINE 200003 GB, vol. 94, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 264-272, XP002547719 ISSN: 0954-6111 the whole document	1-13
	-/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/058354

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GADGIL ANEAL ET AL: "Altered T-cell phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY AUG 2006, vol. 3, no. 6, August 2006 (2006-08); pages 487-488, XP002547720 ISSN: 1546-3222 the whole document	1-13
P, X	LAMBERS C ET AL: "T cell senescence and contraction of T cell repertoire diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease" CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 155, no. 3, March 2009 (2009-03), pages 466-475, XP002546311 ISSN: 0009-9104 the whole document	1-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2009/058354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006105252 A	05-10-2006	NONE	
US 2008044843 A1	21-02-2008	NONE	

---

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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, 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, PE, 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

专利名称(译)	COPD诊断细胞		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011526683A</a>	公开(公告)日	2011-10-13
申请号	JP2011515464	申请日	2009-07-02
申请(专利权)人(译)	载脂蛋白科学股份公司		
[标]发明人	アンカースミットヤンヘンドリック		
发明人	アンカースミット,ヤン,ヘンドリック		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N2333/70514 G01N2333/70521 G01N2800/122 G01N2800/50 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/536.D G01N33/543.597		
优先权	2008450097 2008-07-02 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种诊断患有慢性阻塞性肺病 ( COPD ) 的受试者的风险的方法，包括步骤：从受试者制备样品；测定所述样品中CD4 + CD28无效T细胞的量；并且如果与健康受试者中的CD4 + CD28无效T细胞的量相比，所述CD4 + 28无效T细胞的量减少，则诊断患有COPD的风险。

検査項目	健康者	健康な喫煙者	COPD GOLD I-IV	COPD GOLD I&II	COPD GOLD III&IV
n	15	14	35	19	16
男性/女性	10/5	7/7	20/15	10/9	10/6
年齢	57.20	56.64	59.60	60.68	58.31
(SD)	12.50	9.17	8.01	7.39	8.75
肺機能試験		-			
FVC (L)	4.55	3.84	2.80	3.33	2.14
(SD)	0.94	0.66	1.08	1.06	0.70
FEV1 (%)	105.37	94.40	52.76	70.21	30.67
(SD)	17.11	11.96	23.71	13.33	12.66
FEV1/VC (%)	76.80	75.95	51.18	61.74	37.80
(SD)	7.85	3.99	16.83	8.36	15.33
MEF 50 (%)	100.67	87.64	27.29	39.42	11.93
(SD)	28.92	21.45	18.68	15.93	6.60
MEF 25 (%)	103.53	75.71	29.71	37.37	20.00
(SD)	33.89	31.33	15.31	16.19	5.94