

(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2010-535336

(P2010-535336A)

(43) 公表日 平成22年11月18日(2010.11.18)

(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 Z N A Y	2 G O 5 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	4 B O 6 3
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-519171 (P2010-519171)
 (86) (22) 出願日 平成20年7月29日 (2008.7.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年3月25日 (2010.3.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2008/000464
 (87) 国際公開番号 W02009/017444
 (87) 国際公開日 平成21年2月5日 (2009.2.5)
 (31) 優先権主張番号 0701807-0
 (32) 優先日 平成19年8月2日 (2007.8.2)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(71) 出願人 510021719
 アイエスエス イミューン システム ス
 ティミュレーション アーベー
 スウェーデン, エスエー171 76
 ストックホルム, カロリンスカ ユニ
 ヴァーシティ ホスピタル ソルナ, ア
 ーヴィデー エル2:04, ケア/オブ
 アイティーエイチ イミューン セラ
 ピー ホールディングス アーベー
 (74) 代理人 100094318
 弁理士 山田 行一
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人

最終頁に続く

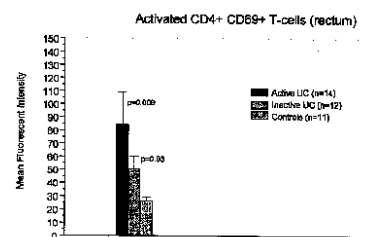
(54) 【発明の名称】 炎症性腸疾患の診断、病期分類、及び監視

(57) 【要約】

胃腸粘膜試料又は胃腸粘膜を排出するセンチネルリンパ節由来の試料において活動性と不活動性のIBDを識別する方法であって、試料から単一細胞の懸濁液を調製するステップと；懸濁液を、直接標識された蛍光DC69抗体を用いてCD4+ヘルパーT細胞の炎症活性化マーカーCD69の発現について分析するステップと；試料中のDC69を発現しているヘルパーT細胞の数を、対応する健常個体の試料から得られる数と比較するステップとを含み、CD69を発現しているヘルパーT細胞のレベルの有意な増大が活動性IBDの存在を表し、ヘルパーT細胞の有意な増大レベルが低いことが不活動性IBDの存在を表す方法。また、潰瘍性大腸(UC)とクローン病(CD)を識別する方法、UC及びCDを検出する方法、並びにIBD患者のステロイド治療に対する感受性を決定する方法も開示する。

【選択図】 図1

Fig. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者において活動性 I B D と不活動性 I B D とを識別する方法であって、
 疾患が疑われる胃腸粘膜、特に遠位回腸粘膜若しくは結腸粘膜、の生検試料又は前記胃腸粘膜を排出するセンチネルリンパ節に由来する生検試料を提供するステップと、
 前記試料から単一細胞の懸濁液を調製するステップと、
 前記単一細胞の懸濁液を、直接標識された蛍光 C D 6 9 抗体を用いて C D 4 + ヘルパー T 細胞の炎症活性化マーカー C D 6 9 の発現について分析するステップと、
 そのように測定された C D 6 9 を発現しているヘルパー T 細胞の数を、対応する健常個体の腸組織から得られた単一細胞の懸濁液で測定された C D 6 9 を発現しているヘルパー T 細胞の数と比較するステップと、を含み、
 C D 6 9 を発現しているヘルパー T 細胞の増加度合いが著しい場合に活動性 I B D が存在することを示し、一方 T の増加度合いがそれほど著しくない場合に不活動性 I B D が存在することを示す方法。

10

【請求項 2】

分析がフローサイトメトリーによるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗体が直接標識された抗体である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体が蛍光抗体である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記増加度合いが著しい場合が、 $p < 0.009$ によって特徴付けられる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記増加度合いがそれほど著しくない場合が、 $0.03 < P < 0.009$ によって特徴付けられる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

I B D 患者において潰瘍性大腸炎とクローン病とを識別する方法であって、
 罹患した腸粘膜又はこのような粘膜を排出するセンチネルリンパ節から得られる患者の生検試料を提供するステップと、
 前記試料から単一細胞の懸濁液を調製するステップと、
 前記懸濁液又はその上清中の、クローン病の指標である活性化ヘルパー T 細胞タイプ 1 (T h 1) によって駆動される免疫活性化で産生されるサイトカインの 1 種又は複数、及び潰瘍性大腸炎の指標である活性化ヘルパー T 細胞タイプ 2 (T h 2) によって駆動される免疫活性化で産生されるサイトカインの 1 種又は複数、を定量するステップと、
 前記定量した T h 1 及び T h 2 サイトカインの量を、対応する顕在化しているクローン病及び / 又は潰瘍性大腸炎の患者で見出される量と比較するステップと、を含む方法。

30

【請求項 8】

活性化ヘルパー T 細胞タイプ 1 によって駆動される免疫活性化で産生されるサイトカインが、I L - 1 2、I F N - 及び T N F - から選択される、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

活性化ヘルパー T 細胞タイプ 2 によって駆動される免疫活性化で産生されるサイトカインが、I L - 4 及び I L - 5 から選択される、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

【請求項 10】

クローン病のマーカーとして、試料中の I g G 1 を定量するステップを更に含む、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記上清中で I L - 1 2、I F N - 及び T N F - のいずれかが定量される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

50

前記上清中で I L - 4 及び I L - 5 のいずれかが定量される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

患者においてクローン病の存在を決定する方法であって、

疾患が疑われる胃腸粘膜、特に遠位回腸粘膜若しくは結腸粘膜、の生検試料又は前記胃腸粘膜を排出するセンチネルリンパ節に由来する生検試料を提供するステップと、

前記試料から単一細胞の懸濁液を調製するステップと、

前記単一細胞の懸濁液から mRNA を単離するステップと、

前記単離した mRNA を、CD69、Tbet、IFN- γ 、TIM-3 のうち 2 種以上の mRNA について分析するステップと、

前記分析結果を、健常個体から同様にして得られた mRNA 中の対応する CD69、Tbet、IFN- γ 、TIM-3 のうち 2 種以上の mRNA の分析結果と比較するステップと、を含み、

前記患者の mRNA 試料中の CD69、Tbet、IFN- γ 、TIM-3 のうち 2 種以上の mRNA の発現増加が、クローン病の指標である方法。

10

【請求項 14】

クローン病の病期分類又はクローン病の療法の監視における、請求項 13 に記載の方法の使用。

【請求項 15】

患者において潰瘍性大腸炎の存在を決定する方法であって、

疾患が疑われる胃腸粘膜、特に遠位回腸粘膜若しくは結腸粘膜、の生検試料又は前記胃腸粘膜を排出するセンチネルリンパ節に由来する生検試料を提供するステップと、

前記試料から単一細胞の懸濁液を調製するステップと、

前記単一細胞の懸濁液から mRNA を単離するステップと、

前記単離した mRNA を、CD69、GATA-3、IL-4、IL-5 のうち 2 種以上の mRNA について分析するステップと、

前記分析結果を、健常個体から同様にして得られた mRNA 中の対応する CD69、GATA-3、IL-4、IL-5 のうち 2 種以上の mRNA の分析結果と比較するステップと、を含み、

前記患者の mRNA 試料中の CD69、GATA-3、IL-4、IL-5 のうち 2 種以上の mRNA の発現増加が、潰瘍性大腸炎の指標である方法。

20

30

【請求項 16】

潰瘍性大腸炎の病期分類又は潰瘍性大腸炎の療法の監視における、請求項 15 に記載の方法の使用。

【請求項 17】

生検試料中の Tbet 発現量の、前記生検試料を採取した患者のクローン病の病期分類のマーカーとしての使用。

【請求項 18】

生検試料中の Tbet 発現量の、前記生検試料を採取した患者のクローン病の活動性相と不活動性相を識別するためのマーカーとしての使用。

【請求項 19】

生検試料中の GATA-3 発現量の、前記生検試料を採取した患者における潰瘍性大腸炎の活動性相と不活動性相を識別するためのマーカーとしての使用。

40

【請求項 20】

IBD 患者のステロイド治療に対する感受性を決定する方法であって、

前記患者から得られる CD4⁺ヘルパー T 細胞におけるグルココルチコイド受容体の発現量を決定するステップを含む方法。

【請求項 21】

前記決定された発現量を、ステロイド治療に应答する IBD 患者若しくは IBD 患者群における対応する発現量及び / 又はステロイド治療に应答しない IBD 患者若しくは IBD 患者群における対応する発現量と比較する、請求項 20 に記載の方法。

50

【請求項 2 2】

前記 I B D 患者における前記決定された発現量が、非応答 I B D 患者群における平均発現量に対して 5 0 % 増加することが、前記患者がステロイド治療に感受性であることを 8 0 % 以上示す、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記非応答 I B D 患者群を選択するための唯一の基準が、ステロイド治療に対して非応答性であることである、請求項 2 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

[発明の分野]

本発明は、炎症性腸疾患の診断、病期分類、及び監視に関する。

【0 0 0 2】

[発明の背景]

炎症性腸疾患 (I B D) は、クローン病 (C D) 及び潰瘍性大腸炎 (U C) を含み、両方とも腸に長期にわたる損傷を引き起こす。近年、 I B D には、顕微鏡的大腸炎、コラーゲン蓄積大腸炎、及びリンパ球性大腸炎も含まれている。外来抗原、免疫反応障害、及び遺伝要因の組合せが I B D の病因となっているようであるが、腸炎の発生機序には不明な点が残っている (1)。今までのところ、例えば、腸への C M V 感染 (2) 及び持続性麻疹ウイルス感染 (3) に由来する抗原等の、多くの可能性のある抗原が提唱されている。

【0 0 0 3】

腸間膜リンパ節は、腸の内容物を排出するものであるが、これが I B D における炎症の発生及び維持にとって重要な部位である可能性が最も高い。炎症を誘発する抗原は、免疫系への提示のために、腸壁からリンパ節に能動的に輸送される (1、4)。腸の排出病理領域である、第 1 リンパ節を同定する技術、及び手術中にこれらの節を回収する技術が開発されてきた (5)。本発明は、細胞表面のマーカー発現及び m R N A 発現アレイプロファイリングに基づいて、様々な I B D の診断及び病期分類を表すために構築されたアッセイを開示する。これらのパターンは、腸炎の種類及び活動性に関連し、それ故、療法に対する応答を含む、疾患活動性の診断、病期分類、及び監視に有用である。

【0 0 0 4】

スウェーデンでは、毎年 1 4 0 0 人が新たに I B D であると診断される。新たに診断される人の数は、近年増加している。 I B D 発生率のピークは、2 0 歳である (6、7)。腸は、免疫担当細胞が広範な内因性及び外因性因子と出会う複雑な微環境である。これらの相互作用は、固有層における T 細胞の豊富さが反映される、連続的で悪性度の低い炎症を生じる (8)。T 細胞は、常時、有害な病原体に対しては作用することができるが、無害な食餌性抗原又は正常な常在性細菌叢のメンバーは無視する。腸免疫系の耐性と反応との間の平衡が崩れたとき、結果的に I B D になることがある。

【0 0 0 5】

C D 及び U C は I B D の 2 つの主要な形である。C D では、腸のいずれの部分が発症する場合もあるが、最も一般的なものは回盲領域 (5 0 %) 及び結腸 (3 0 %) の罹患である。患者の約 3 分の 1 が、随伴性肛門周囲疾患も有している。小腸のいくつかの小区画が発症する場合もあり、しばしば区域性病変として知られている。組織病理学的に、炎症は貫壁性であり、肉芽腫のリンパ球及びマクロファージの密度の濃い浸潤が、患者の最大 6 0 % に見られる。U C は通常直腸が関与し、近位方向に伸長し、この伸長は個々の患者間で変動するが、疾患は常に結腸に限定されたままである。全結腸炎という用語は、炎症に右結腸曲が関与するときにも用いられる。微視的には、粘膜炎症は表在性であり、リンパ球及び顆粒球が豊富である。潰瘍形成及び陰窩膿瘍が一般的である (1)。下痢 (多くの場合、血液を含む)、栄養失調、発熱及び痛みのような長期の炎症に起因する症状とともに、患者はまた上皮異形成及び最終的には腸癌が発生する長期的なリスクを有する (9)。 I B D 患者の約 1 5 % が病型不定型大腸炎を有し、それ故 C D 又は U C の確定診断をする

10

20

30

40

50

ことができない。更により重要なことに、劇症大腸炎の患者の中には、診断に関して不確実性が存在する場合が多い。正確な診断は、早急に必要な内科治療、及び長期的展望では、最良の外科治療について決定するときに重要である。CDの外科治療としては、炎症区画の切除、狭窄形成術による狭窄の治療、罹患区画の大腸切除、又は重篤な大腸炎の場合は結腸全摘及び回腸造瘻が挙げられる。CDにおける再建手術は、腸の連続性を回復させるための回腸直腸吻合であることが多い。骨盤内パウチは、回腸直腸吻合領域における瘻孔形成に関連する合併症のリスクが高いため、ほとんど選択されない。一部の患者は、最後に永続的回腸造瘻を行う。UCのため重篤な大腸炎の患者は、緊急処置として結腸切除及び回腸造瘻により治療される場合が多い。約6カ月後、回腸直腸吻合又は骨盤内パウチのいずれかを、確定した外科治療として選択することができるが、一部の例では永続的回腸造瘻のみが選択し得る解決法となることもある。

10

【0006】

いくつかの証拠から、CDは正常な腸管細菌叢に対する耐性の崩壊の結果であることが暗示されている。ヒトでは、患者の固有層の単核細胞は自己糞便抽出物に応答することが示されているが、これは正常にコントロールされている場合には当てはまらない(10)。T細胞の刺激に対する抗原への依存性は、自己腸内細菌の超音波処理に対してCD患者由来のリンパ球がインビトロで増殖したことが観察されたことから明らかであり、この場合増殖は抗MHCクラスII抗体により阻害された(11)。UCに関して、微環境の役割はそれほど明確にはなっておらず、炎症は、免疫グロブリン(IgG)に依存すると考えられる自己免疫様病因、硬化性胆管炎のような自己免疫疾患との関連、自己抗体の発生頻度、及び大腸粘膜の特異性に基づくと思われる(12)。仮説上、腸に対する免疫反応は、制御性T細胞の不十分な阻害作用の結果である可能性がある(1、4、10)。

20

【0007】

活動性UCは、結腸粘膜内の活性化顆粒球、及び単球/マクロファージの湿潤を特徴とする。これらの浸潤細胞は、炎症促進性サイトカインの主な供給源である。IBD患者は、内科治療に対して耐性が生じる場合がある。可能性のある原因は、顆粒球、サイトカイン、又はステロイド受容体の発現を含む免疫細胞の機能特性の分布変化である。

【0008】

今日、IBDの診断及び病期分類は、内視鏡的基準及び組織病理学に加えて、臨床的パラメータ(アルブミン、SR、CRP、発熱、便の数)の組合せに基づく。炎症活動性は、顕微鏡により評価されるが、生検に存在する一般的な型及び数の細胞しか考慮されない。活動特性は決定されない。

30

【0009】**[発明の目的]**

本発明の目的は、活動性と不活動性腸疾患(IBD)を識別できる方法を提供することである。

【0010】

本発明の別の目的は、IBD患者においてクローン病(CD)と潰瘍性大腸炎(UC)を識別できる診断方法を提供することである。

【0011】

本発明の更なる目的は、病型不定型大腸炎の患者においてクローン病と潰瘍性大腸炎を識別できる方法を提供することである。

40

【0012】

本発明の追加の目的は、発明の概要における研究、図面及び添付する「特許請求の範囲」に例示されるその好ましい実施形態から明らかとなる。

【0013】**[発明の概要]**

本発明は、腸抗原が、粘膜樹状細胞により局所領域腸間膜リンパ節に連続的に輸送されるという洞察に基づいている。このプロセスでは、制御性T細胞は、エフェクターT細胞の調節、ひいては正常抗原に対する応答の阻止において極めて重要な役割を担うことがで

50

きる。

【0014】

動物モデルでは、エフェクターT細胞応答の2つの異なる経路を識別することができる。最初の種類の免疫開始は、活性化ヘルパーT細胞タイプ1 (Th1) によって駆動され、これはIL-12、IFN-ガンマ及びTNF-アルファのようなサイトカインの産生を特徴とする。炎症部位は、マクロファージ及び細胞傷害性エフェクターT細胞 (CD8+) の細胞介在浸潤により支配される。この種の炎症は、CD病変に類似している。ヘルパーT細胞タイプ2 (Th2) の免疫活性化では、体液性の免疫防御系 (免疫グロブリン) が、炎症部位で見られる細胞傷害性T細胞並びにIL-4及びIL-5のようなサイトカイン、並びにIgG1と併せて、重要な役割を果たしている。動物モデルでは、Th2型炎症はヒトUCと共通した特性を有する。

10

【0015】

本発明によれば、炎症組織の生検試料から単離される単一細胞を多色フローサイトメトリーにかけることにより、IBD患者においてクローン病及び潰瘍性大腸炎を識別する方法を開示する。活性化マーカー及びサイトカイン産物の定量により、局部的免疫反応の状態を高精度で決定することが可能になる。本発明の方法はまた、IBD患者における病期分類及び療法の評価にも有用である。

【0016】

本発明の第1の好ましい態様によれば、ヒトにおいてIBDの存在を決定する方法であって、疾患が疑われる遠位回腸粘膜若しくは結腸粘膜由来、又は前記遠位回腸粘膜若しくは結腸粘膜を排出するセンチネルリンパ節由来の生検試料を提供するステップと、CD69活性化マーカーを発現しているCD4 T細胞の数を定量するステップと、前記CD4 T細胞の数を、健常個体及び活動性若しくは不活動性状態のIBDを有するヒトから得られる対応するT細胞の数と比較するステップとを含む方法を提供する。

20

【0017】

本発明の第2の好ましい態様によれば、IBD患者において潰瘍性大腸炎とクローン病を識別する方法を提供する。この方法は、罹患した腸粘膜又はこのような粘膜を排出するセンチネルリンパ節由来の生検試料を提供するステップと、CDの指標である活性化ヘルパーT細胞タイプ1 (Th1) によって駆動される免疫活性化で産生されるサイトカインの1種又は複数、及びUCの指標である活性化ヘルパーT細胞タイプ2 (Th2) によって駆動される免疫活性化で産生されるサイトカインの1種又は複数、を定量するステップと、Th1及びTh2サイトカインの量を、顕在化しているCD及び/又はUCの患者で通常見出されるTh1並びにTh2の量と比較するステップとを含む。好ましいTh1サイトカインはIL-12、IFN- 及びTNF- 、特にIFN- を含む。好ましいTh2サイトカインは、IL-4及びIL-5、特にIL-4を含む。この方法では、独立して又は追加して、クローン病のマーカーとしてIgG1を定量することも好ましい。

30

【0018】

本発明の好ましい態様によれば、IBD生検由来の免疫細胞のmRNA発現プロファイリング (13) をIBDの診断、病期分類、療法及び療法の監視に用いる。

【0019】

本発明の更に好ましい態様によれば、ステロイド治療に対するIBD患者の感受性を決定する方法であって、前記患者から得られるCD4+ヘルパーT細胞におけるグルココルチコイド受容体発現量を決定するステップを含む方法を開示する。

40

【0020】

本出願では、「病期分類」は、IBDにおける活性化段階、炎症の重篤度、炎症の種類等の決定に関連し、一方「監視」は患者におけるIBDの発達を監視することに関連する。

【0021】

本発明の更に好ましい態様は、多数の図を含む図面、及び添付する特許請求の範囲に例示する、以下のその好ましい実施形態の記述を開示する。

50

【0022】

本発明は、ここで、図面に例示される多数の好ましい実施形態を参照することにより、より詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】フローサイトメトリー並びにCD4及び活性化マーカーCD69に対する抗体を用いた、活動性又は不活動性UCの患者由来、及び健常対照由来の生検の単一細胞懸濁液の調査を示すグラフであり、CD4+細胞の平均蛍光強度をy軸にとる。

【図2】健常対照、活動性又は不活動性UCの患者、及び不活動性CDの患者からの生検を調査したフローサイトメトリー(FACS)で見られる活性化CD69+CD4+T細胞の百分率の相互関係を示すグラフである。

【図3】異なる病期段階の疾患の患者のIBDスコアの、生検を調査したFACSにおける活性化CD69+CD4+T細胞の百分率との相互関係を示すグラフである。

【図4】CD患者の炎症領域を排出する、非センチネル節、センチネル節1、及びセンチネル節2由来の培養上清中のIFN- γ の産生を示すグラフである。

【図5】UC患者の炎症領域を排出する、非センチネル節(NSLN)及びセンチネル節(SLN)由来の培養上清中のIL-4の産生を示すグラフである。

【図6】グルコルチコイド治療に応答しないIBD患者由来のCD4+ヘルパーT細胞中のグルコルチコイド受容体の細胞内発現レベルの低下を示すグラフである。

【図7】活動性CDの患者の腸管由来のCD4+ヘルパーT細胞においてTbet発現は上昇するが、一方不活動性相におけるTbet発現は低いことを示すグラフである。

【図8】活動性CDの患者の腸管由来のCD4+ヘルパーT細胞においてTbet発現は上昇するが、一方不活動性相におけるTbet発現は低いことを示すグラフである。更に、UCの患者由来のCD4+ヘルパーT細胞におけるTbet発現は、活動性CDに見られるTbet発現に比べて低い。

【図9】活動性UCの患者の腸管由来のCD4+ヘルパーT細胞においてGATA-3発現は上昇するが、一方不活動性相におけるGATA-3発現は低いことを示すグラフである。

【0024】

[発明の詳細な説明]

材料及び方法

単一細胞懸濁液を新鮮な生検から作製した。フローサイトメトリー(FACS)は、4つを組み合わせたFITC、PE、PerCp、APCコンジュゲートを用いて、直接標識された蛍光抗体CD4、CD8、CD69、CD25、CD14、CD9、CD66b、CD19を用いて実施した。アイソタイプ抗体を対照として用いた。CD及びUCでは、炎症を起こした腸及び罹患していない正常腸を排出するセンチネル節を、比較分析のために炎症領域の周りに注入した、トレーサー物質であるパテントブルー(Patent Blue)を用いて同定した。また、各患者から静脈血試料を採取した。

【0025】

サイトカインIL-4及びIFN- γ の分析は、サンドイッチELISA(R&D systems)を用いて生検又はセンチネル節由来の単一細胞培養上清で実施した。

【0026】

グルコルチコイド受容体の発現の分析は、マウス抗ヒトグルコルチコイド受容体抗体を用い、続いてサポニン透過化単一細胞の抗マウスIgG FITCのコンジュゲートした検出抗体を用いて実施した。

【0027】

単一細胞懸濁液からのRNA単離は、トリゾール(TRIZOL)試薬(Invitrogen、カタログ番号15596-026)を用いて実施した。サンプルあたり100ngのRNAを加え、製造業者のプロトコルにしたがって、アイスクリプト(iScript)(商標)cDNA合成キットを用いた逆転写酵素反応を行った。定量PCRは、2

10

20

30

40

50

× I Q (商標) S Y B R (登録商標) グリーンスーパーミックス (Green Supermix) を用いてアイサイクラー (iCycler) I Q で実施した。サイクル閾値は、B I O - R A D 製のアイサイクラー I Q (商標) 光学系ソフトウェアバージョン 3.1 を用いて得た。発現レベルは、 2^{-C_t} 法を用いて R P I I に正規化した。或いは、単離した R N A を c D N A 合成、F A M 標識に供し、その後 A f f y m e t r i x ヒトアレイチップを用いて分析した。

【0028】

プライマー配列 Q T - P C R :

```

I F N   Q T   F w r d   G C A G G T C A T T C A G A T G T A G C G G
I F N   Q T   R e v   T G T C T T C C T T G A T G G T C T C C A C A C
I L - 4  Q T   F w r d   C A C A A C T G A G A A G G G A A A C C T T C T G
I L - 4  Q T   R e v   C T C T C T C A T G A T C G T C T T T A G C C T T T C
T - b e t  Q T   F w r d   C A C T A C A G G A T G T T T G T G G A C G T G
T - b e t  Q T   R e v   C C C C T T G T T G T T T G T G A G C T T T A G
G A T A 3  Q T   F w r d   A A C T G T C A G A C C A C C A C A A C C A C A C
G A T A 3  Q T   R e v   G G A T G C C T T C C T T C T T C A T A G T C A G G

```

10

【0029】

実施例 1

粘膜又は I B D に罹患している領域を排出するセンチネルリンパ節内の免疫細胞の調査。粘膜又は I B D に罹患している領域を排出するセンチネルリンパ節内の免疫細胞のフローサイトメトリーによる調査は、健常対照と比較して、C D 4 + ヘルパー T 細胞における活性化マーカー C D 6 9 の発現 (図 1) 及び活動性 I B D の患者の C D 8 + 細胞傷害性 T 細胞の発現の有意な増大 ($p < 0.009$) を示す。不活動性 I B D の患者 (有能な病理学者の判断において) は、それにもかかわらず、活性化マーカー C D 6 9 の発現上昇に加えて、C D 4 + T 細胞の活性化の有意な増大 ($p < 0.03$) を示す (図 1)。C D 4 + C D 6 9 + T 細胞の数はまた、健常対照及び報告された不活動性 I B D の患者と比較して、潰瘍性大腸炎及びクローン病の両方において活動性 I B D の患者で増加する (図 2)。

20

【0030】

実施例 2

患者の I B D スコアとフローサイトメトリープロファイルとの相互関係。フローサイトメトリープロファイルによる、S - アルブミン、C R P、及び 1 日あたりの血液を含む便の数を含む患者の I B D スコアを図 3 に示す。C D 6 9 活性化マーカーを発現している C D 4 + T 細胞の数は、I B D スコア (S E O 指数) とよく相関していた。

30

【0031】

S E O 指数を利用して、結果と疾患の活動性との相互関係を示した。この指数は、臨床的 (便の頻度及び血便) 及び検査パラメータ (H b、アルブミン、及び赤血球沈降速度) を用いる。本発明者らの材料では、赤血球沈降速度は C R P (C - 反応性タンパク質) により置き換えられた。

【0032】

実施例 3

C D 及び U C の両方における、腸の病変領域を排出するセンチネル節、並びに罹患していないセグメントを排出する節での免疫反応。現在、C D における免疫反応は、T h 1 応答と見なされており、一方 U C は非定型 T h 2 活性化に類似している場合がある。この見解は、主に、人工的な手段により大腸炎を刺激する動物モデルに基づいているように思われる。ヒトでは、I B D の炎症経路の特徴付けは限られている；結腸の癌流検査に加えて末梢血液細胞の分析は、動物モデルの観察結果の一部を支持するが、病態生理の概要は不完全である。本発明による C D 及び U C の両方における、腸の病変領域を排出するセンチネル節、及び罹患していないセグメントを排出する節における免疫反応及びサイトカインパターンの判定は、サイトカインの放出を C D 及び U C 診断で用い得ることを示唆する。

40

50

【0033】

普及している基準により、IBD患者の15%は、病型不定型大腸炎を有すると考えられる、すなわち、確定診断することができない。しかしながら、正確な診断は、それにもかかわらず、更なる治療時の判断において重要である。また、劇症大腸炎においてCD及びUCを識別する(differ)ことは不可能である場合が多く、これは適切な内科治療を遅延させ、結腸切除による早期外科的介入を必要とすることがある。多量のIFN- γ が、現在、CD患者の胃腸炎症部位で同定されている(図4)。対照的に、UC患者の胃腸炎症部位は、大量のTh2サイトカインIL-4を含有することが見出されている(図5)。これらの所見により、胃腸生検試料中の高IFN- γ 含量とCDとを関係づけること、IL-4の大量産生とUCとを関係づけることが可能になる。これらのマーカーにより、正確な診断が困難である場合が多い、劇症大腸炎においてもCD及びUCを識別することが可能になる。腸生検から得られる情報を用いて、より正確なテーラーメイド医療のため、かつ一部の患者における結腸全摘及び回腸造瘻による外科的介入を防ぐために、早期に正確な診断をすることができる。

10

【0034】

同様の方式で、好中球、好酸球、NK細胞、NKT細胞、制御性T細胞、及びB細胞のような他の免疫細胞の活性化マーカーの多色フローサイトメトリー分析は、IBDの診断、病期分類、及び監視に有用であり得る。

【0035】

実施例4

ステロイド受容体の発現プロファイルの決定。一部のIBD患者がステロイド治療に対して耐性になる場合があることは、周知の問題である。本発明によれば、これらの細胞がステロイド治療に対して感受性であるかどうかを決定するための、ウエスタンブロット又は生検由来の単一細胞の細胞内フローサイトメトリーを用いる、IBD患者のステロイド受容体発現プロファイルの調査を開示する。ステロイドに感受性応答する患者又はステロイド治療に感受性を有しない患者由来の腸生検又は単一細胞懸濁液を、細胞内フローサイトメトリーにより、ステロイド受容体発現の程度について調査した。ステロイド不応性IBDの患者は全て、グルココルチコイド受容体の発現レベルが低い、一方ステロイド治療により腸治癒し及び低いSEO指数を示す患者はより高いレベルで発現した(図6)。したがって、腸リンパ球におけるステロイド受容体の発現レベルは、治療に対する感受性と相関する。

20

30

【0036】

実施例5

サイトカイン発現アレイプロファイリング。本発明によれば、IBD患者由来の生検中の免疫細胞のサイトカイン発現パターンのより詳細な像が、発現アレイプロファイリングにより得られる。この種のプロファイリングは、20kのAffymetrixチップを用いて実施した。CD患者で見られるTh1活性化パターンは、CD69及びTbet、IFN- γ 及びTIM-3のmRNAの発現増加により引き起こされると思われる。対照的に、Th2の発現パターンは、UC患者で見られ、CD69に加えて、GATA-3及びIL-4、IL-5の発現増加が注目される。アレイでの所見は、リアルタイム定量PCR(QT-PCR)により確認された。したがって、CD患者由来の細胞は、高いTbet転写産物の発現レベルを示し(図8)、一方GATA-3転写産物はUC患者由来の細胞で増加した(図9)。Tbetの発現は、更に、活動性相のCD患者において実質的に増加することが見出された(図7)。それ故、発現プロファイルのパネルに基づいて、CDにおけるTh1の優位性は、Tbet、IFN- γ 及びTIM-3の発現増加により予測できる。結果として、Th2の優位性及びUCは、GATA-3及びIL-4、IL-5転写産物の発現増加により予測できる。

40

【0037】

参考文献

1. Bouma G, Strober W. The immunological

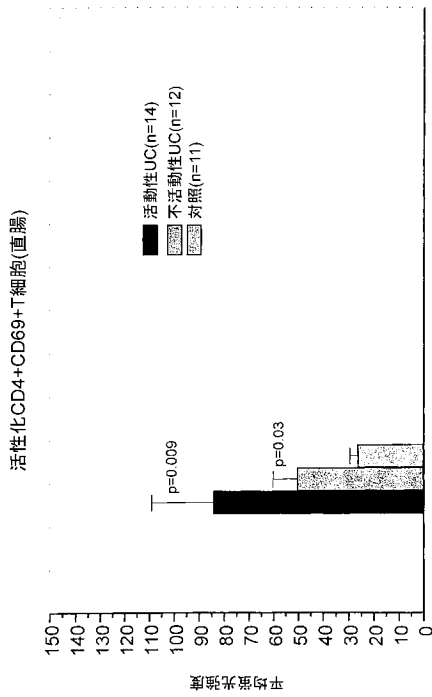
50

- and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* 2003; 3: 521-533.
2. Rahbar A, Bostrom L, Lagerstedt U, Magnusson I, Soderberg-Naucler C, Sundqvist VA. Evidence of active cytomegalovirus infection and increased production of IL-6 in tissue specimens obtained from patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 3:154-61. 10
3. Wakefield EJ, Ajioka A, Dhillon AP, Pittillo RM, Pounder RE. Crohn's disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* 108:911-916, 1995.
4. Toms C, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Microbes and Infection* 2001; 3: 929-935.
5. Thorn M. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy: is the method applicable to patients with colorectal and gastric cancer? *Eur J Surg* 2000; 166: 755-758. 20
6. Lapidus A, Bernell O, Hellers G, Persson PG, Lofberg R. Incidence of Crohn's disease in Stockholm County 1955-1989. *Gut* 1997; 41: 480-486.
7. Tysk C, Jarnerot G. Ulcerative proctocolitis in Orebro, Sweden. A retrospective epidemiologic study, 1963-1987. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 945-50. 30
8. Wittig BM, Zeitz M. The gut as an organ of immunology. *International Journal of Colorectal Disease* 2002: e-journal.
9. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323: 1228-33.
10. Strober W, Kelsall B. To be responsive or not to be responsive, that is the mucosal question. *Gastroenterology* 1998; 114: 214-217. 40
11. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer-zum-Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 448-455.
12. Macdonald TT, Monteleone G, Pender SLF. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scan J* 50

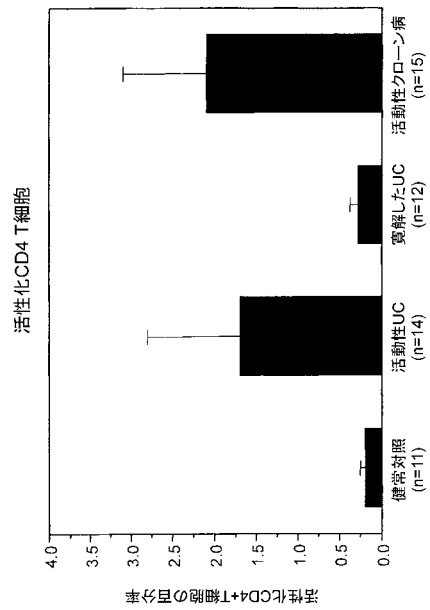
Immunol. 2000; 51: 2-9.

13. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. Nat Genet. 1996 14(4): 457-60.

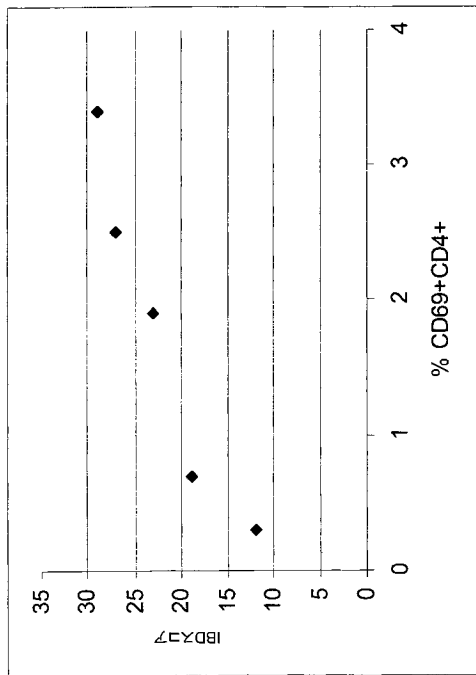
【 図 1 】



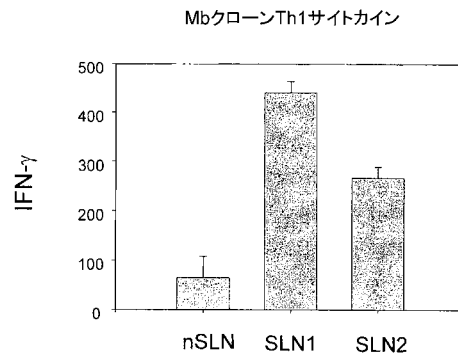
【 図 2 】



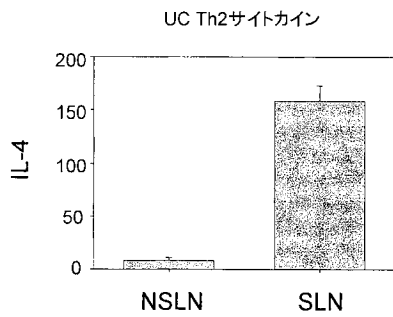
【 図 3 】



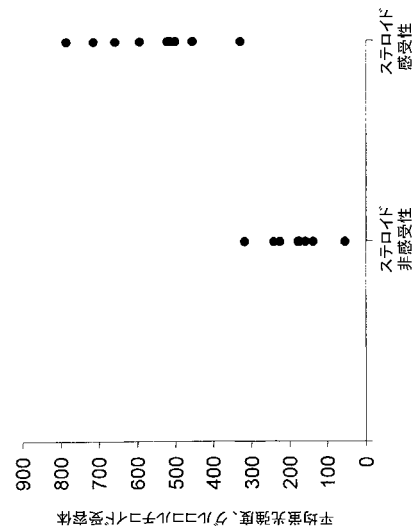
【 図 4 】



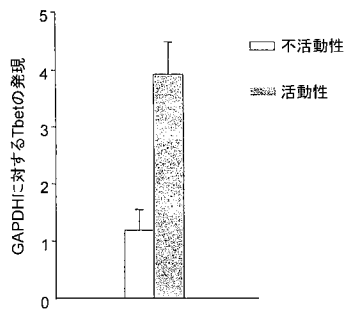
【 図 5 】



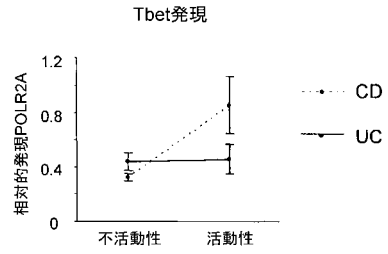
【 図 6 】



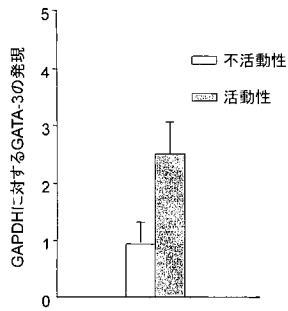
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2008/000464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC: see extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)	
IPC: G01N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
SE,DK,FI,NO classes as above	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)	
EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM. ABS DATA	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
A	POLKO, J. et al, "Význam stanovenia lymfocytov v bioptických vzorkách črevnej sliznice prietokovou cytometriou v posúdení aktivity ulceróznej kolitídy", Vnitřní lékařství, 2002, Vol. 48, No. 3, page 197 - page 201, page 199, column 1, paragraph 2, tables 1, 2, abstract --
A	GARCÍA DE TENA, JAIME et al, "Active Crohn's Disease Patients Show a Distinctive Expansion of Circulating Memory CD4+CD45RO+CD28null T Cells 1", Journal of Clinical Immunology, Mars 2004, Vol. 24, No. 2, page 185 - 196, table 2 --
	Relevant to claim No.
	1-6
	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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 January 2009	4 -01- 2009
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Terese Sandström/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2008/000464

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HOVE, TESSA et al, "Marked Difference of CD4+CD45RBhigh Expression by Gut Derived T Lymphocytes in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis; Differential Cytokine Synthesis of CD45RB Subpopulations", Gastroenterology, 2001, Vol. 120, No. 5, Suppl. 1 --	1-6
A	WO 2004001073 A1 (INDEX PHARMACEUTICALS AB), 31 December 2003 (31.12.2003), abstract --	1-6
A	WO 2005009339 A2 (MOLECULAR STAGING, INC.), 3 February 2005 (03.02.2005), the claims --	1-6
A	SCHMIDT, C. et al, "Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease", Minerva Gastroenterol Dietol, 2005, Vol. 51, paage 127 - page 145, paragraphs "crohn's disease" & "ulcerative colitis" -----	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2008/000464
--

International patent classification (IPC)

G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/57 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01)

Download your patent documents at www.prv.se

The cited patent documents can be downloaded at www.prv.se by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **QLHCSEHLVFQ**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2008/000464

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1 - 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
.../...
2. 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:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- .../...
1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
 3. 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.:
 4. 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.: 1 - 6
.../...

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2008/000464
--

Box II.1

Claims 1-6 relate to a method which may involve surgery on the human or animal body/Rule 39.1(iv).

The expression, "providing a biopsy sample", is open for various interpretations, and can include the actual taking of a body sample. This is considered to relate to a non-allowable method according to Rule 39.1(iv).

Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the technical content of the claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2008/000464
--

Box III

The following separate inventions were identified:

1: Claims 1-6 directed to a method of differentiating between active and inactive inflammatory bowel disease (IBD) by analyzing the expression of the marker CD69 on CD4+ T helper cells.

2: Claims 7-12 directed to a method of differentiating between ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) by determining the amount of one or more of cytokines produced in immune activation driven by activated T helper cells type 1 indicative of CD and one or more of cytokines produced in immune activation driven by activated T helper cells type 2 indicative of UC.

3: Claims 13-14 directed to a method of determining the presence of CD by analyzing the mRNA of two or more of CD69, Tbet, IFN- γ and TIM-3.

4: Claims 15-16 directed to a method of determining the presence of UC by analyzing the mRNA of two or more of CD69, GATA-3, IL-4 and IL-5.

5: Claims 17-18 directed to the use of Tbet expression as a marker for staging CD, e.g. for differentiating between an active and an inactive phase of CD.

6: Claim 19 directed to the use of GATA-3 expression as a marker for differentiating between an active and an inactive phase of UC.

7: Claims 20-23 directed to a method of determining the susceptibility of an IBD patient to steroid treatment comprising determination of glucocorticoid receptor expression in CD4+ T helper cells.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

01/11/2008

International application No.

PCT/SE2008/000464

WO	2004001073	A1	31/12/2003	AU	2003239087	A	06/01/2004
				CA	2488823	A	31/12/2003
				EP	1534855	A	01/06/2005
				EP	1585385	A	19/10/2005
				JP	2005530518	T	13/10/2005
				SE	0201954	D	00/00/0000
				US	7378239	B	27/05/2008
				US	20040241823	A	02/12/2004
				US	20080193945	A	14/08/2008
				DE	60217710	D,T	15/11/2007
				EP	1450762	A,B	01/09/2004
				SE	1450762	T3	
				JP	2005507408	T	17/03/2005
				SE	0201956	D	00/00/0000
				US	20050037081	A	17/02/2005
				AU	2002365782	A	17/06/2003
				DE	60218888	D,T	29/11/2007
				EP	1451953	A,B	01/09/2004
				SE	0202251	D	00/00/0000
				AU	2002360019	A	00/00/0000
				BR	0214460	A	03/11/2004
				EP	1461586	A	29/09/2004
				SE	0202252	D	00/00/0000
				US	6931738	B	23/08/2005
				US	20040261278	A	30/12/2004
				AU	2002356491	A	09/07/2003
				SE	0202256	D	00/00/0000
<hr/>							
WO	2005009339	A2	03/02/2005	EP	1667669	A	14/06/2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68 A

(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 ソーン, マグヌス
スウェーデン, エスエー - 7 5 2 2 6 アップサラ, ゲイアースガタン 2 1 アー

(72)発明者 ウィンクヴィスト, オラ
スウェーデン, エスエー - 7 5 6 5 3 アップサラ, スヴァンカースヴァゲン 3 2 エフ

Fターム(参考) 2G054 AA08 AB05 CE02 EA03

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42

QR50 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS34 QS36 QS39 QX02

专利名称(译)	炎症性肠病的诊断，分期和监测		
公开(公告)号	JP2010535336A	公开(公告)日	2010-11-18
申请号	JP2010519171	申请日	2008-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	アイエスsイミュンシステムステイミュレーションアーベー		
申请(专利权)人(译)	艾SS免疫系统刺激的安倍晋三		
[标]发明人	ソーンマグヌス ウインクヴィストオラ		
发明人	ソーン, マグヌス ウインクヴィスト, オラ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N21/78 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/505 G01N2333/705 G01N2800/065 G01N2800/52 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Y G01N33/53.P G01N33/53.M G01N33/543.597 G01N21/78.C C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	2G054/AA08 2G054/AB05 2G054/CE02 2G054/EA03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	池田 成人		
优先权	0701807 2007-08-02 SE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于鉴定IBD的活性和非活性的样品中从前哨淋巴结引流胃肠粘膜样品或胃肠粘膜，其包括以下步骤的方法：从样品制备单细胞悬液；悬浮液和分析采用直接标记的荧光DC69抗体细胞CD69的CD4 +辅助性T炎症活化标记物的表达的步骤；比较样品中表达DC 69的辅助性T细胞的数量与从相应健康个体的样品获得的数量和表达CDD的辅助性T细胞水平的显著增加69表示活性IBD的存在，并且辅助性T细胞的低水平显著增加表明存在无活性的IBD。还公开了区分溃疡性结肠（UC）和克罗恩病（CD）的方法，检测UC和CD的方法，以及确定IBD患者对类固醇治疗的易感性的方法。

Fig. 1

