

(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2013-504075

(P2013-504075A)

(43) 公表日 平成25年2月4日(2013.2.4)

(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	D	4 H O 4 5
C O 7 K 14/50	(2006.01)	C O 7 K 14/50	Z N A	
C O 7 K 14/47	(2006.01)	C O 7 K 14/47		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2012-528396 (P2012-528396)	(71) 出願人	512058663
(86) (22) 出願日	平成22年9月7日 (2010.9.7)		フンダシオン ホスピタル ナショナル
(85) 翻訳文提出日	平成24年4月20日 (2012.4.20)		デ パラブレジコス パラ ラ インベス
(86) 国際出願番号	PCT/ES2010/070584		ティガシオン イ ラ インテグラシオン
(87) 国際公開番号	W02011/045456		(フーンパイイン)
(87) 国際公開日	平成23年4月21日 (2011.4.21)		スペイン, トレド 45071, エス
(31) 優先権主張番号	P200930661		/エヌ, フィンカ ラ ペラレダ
(32) 優先日	平成21年9月7日 (2009.9.7)	(74) 代理人	100107456
(33) 優先権主張国	スペイン (ES)		弁理士 池田 成人
(31) 優先権主張番号	P201030090	(74) 代理人	100148596
(32) 優先日	平成22年1月25日 (2010.1.25)		弁理士 山口 和弘
(33) 優先権主張国	スペイン (ES)	(74) 代理人	100123995
			弁理士 野田 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患組織病理の新規バイオマーカー

(57) 【要約】

単離された生物学的液体サンプル中の F G F - 2 タンパク質及びアノスミン - 1 タンパク質の量の検出を用いて、中枢神経系 (C N S) 脱髄疾患を患う患者の病変についての組織病理を予測するための、 F G F - 2 タンパク質及びアノスミン - 1 タンパク質の使用。さらに本発明は、 C N S 脱髄疾患を患う患者の病変の組織病理学的な特性を確かめる方法、及び前記方法の実行のためのキットに関する。好ましくは C N S 脱髄疾患は多発性硬化症であり、生物学的液体は脳脊髄液 (C S F) である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された生物学的液体サンプル中の FGF - 2 タンパク質、アノスミン - 1 タンパク質又は両タンパク質の量を検出することにより、発生可能性のある、脱髄疾患好ましくは中枢神経系 (CNS) 脱髄疾患、を有する対象の病変についての組織病理を予測するための、FGF - 2 タンパク質、アノスミン - 1 タンパク質又は両タンパク質の組み合わせの使用。

【請求項 2】

単離された生物学的液体サンプル中の FGF - 2 タンパク質の量を検出することにより、発生可能性のある、好ましくは CNS の脱髄疾患を有する対象の病変についての組織病理を予測するための、請求項 1 に記載の FGF - 2 タンパク質の使用。

10

【請求項 3】

単離された生物学的液体サンプルが体液であり、好ましくは脳脊髄液 (CSF)、血液、血清、血漿及び涙液を含むリストから選択される、請求項 1 又は 2 に記載の FGF - 2 タンパク質の使用。

【請求項 4】

単離された生物学的液体サンプルが CSF である、請求項 3 に記載の FGF - 2 タンパク質の使用。

【請求項 5】

脱髄疾患が CNS を冒し、多発性硬化症、デビック視神経脊髄炎、急性播種性脳炎、急性横断性脊髄炎、急性又は亜急性の出血性白質脳炎、急性播種性脱髄、びまん性硬化症、脳梁の中心性脱髄、橋中心髄鞘崩壊、亜急性壊死性脊髄炎、同心円性硬化症、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、カナパン病、クラッペ病及びツェルウェーガ症候群を包含するリストから選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の FGF - 2 タンパク質の使用。

20

【請求項 6】

CNS 脱髄疾患が多発性硬化症である、請求項 5 に記載の FGF - 2 タンパク質の使用。

【請求項 7】

CNS 脱髄疾患が一次進行型多発性硬化症、再発寛解型多発性硬化症、進行性再発寛解型多発性硬化症、二次進行型多発性硬化症、臨床分離症候群 (CIS) 又は任意の臨床症状の多発性硬化症であり、好ましくは一次進行型多発性硬化症又は二次進行型多発性硬化症である、請求項 6 に記載の FGF - 2 タンパク質の使用。

30

【請求項 8】

脱髄疾患が末梢神経系 (PNS) を冒し、好ましくはギラン・バレー症候群である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の FGF - 2 タンパク質の使用。

【請求項 9】

アノスミン - 1 タンパク質もまた、脱髄疾患、好ましくは CNS 脱髄疾患の検出のためのバイオマーカーとして用いられることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の使用。

40

【請求項 10】

アノスミン - 1 タンパク質レベルもまた、単離された生物学的サンプル中で、好ましくは単離された生物学的液体中で検出されることを特徴とする、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

(a) 対象からの単離された生物学的サンプル、好ましくは単離された生物学的液体を取得するステップと、

(b) ステップ (a) の生物学的サンプル中の FGF - 2 タンパク質の量を検出するステップと、

(c) ステップ (b) で検出された量を参照量と比較するステップとを含む、CNS 脱髄疾患を有する対象又は患者の病変の組織病理を予測するのに有用なデ

50

ータを取得する方法。

【請求項 1 2】

(d) 白質における少なくとも 1 つの慢性若しくは非活動性の病変の存在及び / 又は灰白質の血液脳関門ダメージの実存を予測するステップをさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

ステップ (d) にて、ステップ (b) で検出された FGF - 2 タンパク質の量がステップ (c) で比較される参照量より多いことが、白質における少なくとも 1 つの慢性若しくは非活動性の病変の存在及び / 又は灰白質の血液脳関門ダメージの実存を指し示している、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

単離された生物学的サンプルが生物学的体液であり、好ましくは CSF、血液、血清、血漿及び涙液を包含するリストから選択される、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

脱髄疾患が CNS を冒し、多発性硬化症、デビック視神経脊髄炎、急性播種性脳炎、急性横断性脊髄炎、急性又は亜急性の出血性白質脳炎、急性播種性脱髄、びまん性硬化症、脳梁の中心性脱髄、橋中心髄鞘崩壊、亜急性壊死性脊髄炎、同心円性硬化症、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、カナパン病、クラッペ病及びツェルウェガー症候群を包含するリストから選択される、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

CNS 脱髄疾患が多発性硬化症である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

CNS 脱髄疾患が一次進行型多発性硬化症、再発寛解型多発性硬化症、進行性再発寛解型多発性硬化症、二次進行型多発性硬化症、臨床分離症候群 (CIS) 又は任意の臨床症状の多発性硬化症であり、好ましくは一次進行型多発性硬化症又は二次進行型多発性硬化症である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

脱髄疾患が PNS を冒し、好ましくはギラン・バレー症候群である、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 9】

FGF - 2 タンパク質の量の検出がイムノアッセイを用いて行われる、請求項 1 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

イムノアッセイが酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

アノスミン - 1 タンパク質レベルもまた、対象からの単離された生物学的サンプル中で、好ましくは単離された生物学的液体中で検出されて参照量と比較され、前記サンプルが FGF - 2 タンパク質の検出に用いられたサンプルと同じであっても異なってもよい、請求項 1 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 2】

請求項 1 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の任意の方法を行うためのキット。

【請求項 2 3】

脱髄疾患、好ましくは CNS 脱髄疾患の検出のためのバイオマーカーとしてのアノスミン - 1 タンパク質の使用。

【請求項 2 4】

単離された生物学的サンプル中で、好ましくは単離された生物学的液体中で脱髄疾患を検出するための、請求項 2 3 に記載のアノスミン - 1 タンパク質の使用。

【請求項 2 5】

50

単離された生物学的液体サンプル中のアノスミン - 1 タンパク質の量を検出することにより、発生可能性のある、脱髄疾患、好ましくは CNS 脱髄疾患を有する対象の病変についての組織病理診断を予測するための、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のアノスミン - 1 タンパク質の使用。

【請求項 2 6】

単離された生物学的液体サンプルが体液であり、好ましくは CSF、血液、血清、血漿及び涙液を包含するリストから選択される、請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のアノスミン - 1 タンパク質の使用。

【請求項 2 7】

単離された生物学的液体サンプルが CSF である、請求項 2 6 に記載のアノスミン - 1 タンパク質の使用。

10

【請求項 2 8】

脱髄疾患が CNS を冒し、多発性硬化症、デビック視神経脊髄炎、急性播種性脳炎、横断性脊髄炎、急性又は亜急性の出血性白質脳炎、急性播種性脱髄、びまん性硬化症、脳梁の中心性脱髄、橋中心髄鞘崩壊、亜急性壊死性脊髄炎、同心円性硬化症、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、カナパン病、クラッペ病及びツェルウェーガ症候群を包含するリストから選択される、請求項 2 3 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のアノスミン - 1 タンパク質の使用。

【請求項 2 9】

CNS 脱髄疾患が多発性硬化症である、請求項 2 8 に記載のアノスミン - 1 タンパク質の使用。

20

【請求項 3 0】

CNS 脱髄疾患が一次進行型多発性硬化症、再発寛解型多発性硬化症、進行性再発寛解型多発性硬化症、二次進行型多発性硬化症、臨床分離症候群 (CIS) 又は任意の臨床症状の多発性硬化症であり、好ましくは一次進行型多発性硬化症又は二次進行型多発性硬化症である、請求項 2 9 に記載のアノスミン - 1 タンパク質の使用。

【請求項 3 1】

脱髄疾患が PNS を冒し、好ましくはギラン・バレー症候群である、請求項 2 3 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のアノスミン - 1 タンパク質の使用。

【請求項 3 2】

(a) 対象からの単離された生物学的サンプル、好ましくは単離された生物学的液体を取得するステップと、

30

(b) ステップ (a) の生物学的サンプル中のアノスミン - 1 タンパク質の量を検出するステップと、

(c) ステップ (b) で検出された量を参照量と比較するステップと

を含む、脱髄疾患の検出のために、又は CNS 脱髄疾患を有する対象若しくは患者の病変の組織病理を予測するのに有用なデータを取得する方法。

【請求項 3 3】

(d) 白質における少なくとも 1 つの慢性若しくは非活動性の病変の存在及び / 又は灰白質における血液脳関門ダメージの実存を予測するステップをさらに含む、請求項 3 2 に記載の方法。

40

【請求項 3 4】

ステップ (d) にて、ステップ (b) で検出されたアノスミン - 1 タンパク質の量がステップ (c) で比較される参照量より多いことが、白質における少なくとも 1 つの慢性若しくは非活動性の病変の存在及び / 又は灰白質における血液脳関門ダメージの実存を指し示している、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

単離された生物学的サンプルが生物学的体液であり、好ましくは CSF、血液、血清、血漿及び涙液を含むリストから選択される、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 36】

脱髄疾患が CNS を冒し、多発性硬化症、デビック視神経脊髄炎、急性播種性脳炎、急性横断性脊髄炎、急性又は亜急性の出血性白質脳炎、急性播種性脱髄、びまん性硬化症、脳梁の中心性脱髄、橋中心髄鞘崩壊、亜急性壊死性脊髄炎、同心円性硬化症、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、カナパン病、クラッペ病及びツェルウェーガ症候群を含むリストから選択される、請求項 32 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

CNS 脱髄疾患が多発性硬化症である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

CNS 脱髄疾患が一次進行型多発性硬化症、再発寛解型多発性硬化症、進行性再発寛解型多発性硬化症、二次進行型多発性硬化症、臨床分離症候群 (CIS) 又は任意の臨床症状の多発性硬化症であり、好ましくは一次進行型多発性硬化症又は二次進行型多発性硬化症である、請求項 37 に記載の方法。

10

【請求項 39】

脱髄疾患が PNS を冒し、好ましくはギラン・バレー症候群である、請求項 32 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

アノスミン - 1 タンパク質の量の検出がイムノアッセイを用いて行われる、請求項 32 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

イムノアッセイが酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) である、請求項 40 に記載の方法。

20

【請求項 42】

請求項 32 ~ 41 のいずれか一項に記載の任意の方法を行うためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生物医学の分野に関する。具体的には、本発明は、単離された生物学的液体サンプル中の FGF - 2 及びアノスミン - 1 のタンパク質の量を検出することにより、中枢神経系 (CNS) の脱髄疾患を有する個体の病変についての組織病理を予測するための、タンパク質である FGF - 2 及びアノスミン - 1 の使用に関連するものである。さらに本発明は CNS の脱髄疾患を有する個体の病変の組織病理学的な特徴を理解する方法であって、かかる方法の実行のためのキットを用いる方法に関する。好ましくは CNS 脱髄疾患は多発性硬化症であり、生物学的液体は脳脊髄液 (CSF) である。

30

【背景技術】

【0002】

脱髄疾患は深刻な臨床的及び社会的問題である。脱髄疾患は、様々な理由のため、髄鞘に被覆された神経軸索へのダメージがある一連の神経系疾患であり、髄鞘は神経インパルス伝導を保護し促進するものである。脱髄疾患のうち最も蔓延しているものは多発性硬化症である。

40

【0003】

多くの場合、多発性硬化症は、この病態の典型的な神経学的変質を伴った突発 (又は急性期) を有する疾患として始まる。各々の突発の後には寛解期が続き、寛解期の後は、患者は異なる重症度を有する後遺症を被ることもあり、被らないこともある。大半の場合、多発性硬化症の突発期の後、疾患は患者が持続的な神経脱落を被る二次的な進行型へと派生し、障害は着実に進行性に増進する (Confavreuxら、N. Eng. J. Med.、2000年、vol. 343、1430 ~ 1438 ページを参照)。

【0004】

多発性硬化症の場合、CNS におけるミエリン産生細胞であるオリゴデンドロサイトは、脱髄プラークとしても知られる損傷領域において死滅する。オリゴデンドロサイトは出

50

生前発達中及び出生後発達中にオリゴデンドロサイト前駆細胞から生じるが、このオリゴデンドロサイト前駆細胞は全哺乳類の成体の脳内にも存在する細胞である。損傷にตอบสนองして、オリゴデンドロサイト前駆細胞は損傷した脳領域へと動員されるが、病変の発展ステージによって、内部に入って髄鞘を修復することもあり、しないこともある (Wolswijk, J. Neurosci., 1998年, vol. 18, 601~609ページ、Changら, J. Neurosci., 2000年, vol. 20, 6404~6412ページ、Changら, N. Engl. J. Med., 2002年, vol. 346, 165~173ページ; Reynoldsら, J. Neurocytol., 2002年, vol. 31, 523~536ページ; Chandranら, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 2008年, vol. 363, 171~183ページを参照)。

10

【0005】

近年における多発性硬化症を(治療ではなく)緩和するための現存治療はCNSにおける現存の炎症レベルを低減しようとするものだが、修復を必要とする領域へのオリゴデンドロサイト前駆細胞の動員を目的としたものではない。従って、幹細胞、間葉系細胞又はオリゴデンドロサイト前駆細胞自身(内因性の細胞を包含する)のいずれかを用いることによる細胞治療は、多発性硬化症の治療についての有望な将来である。従って、各々の多発性硬化症患者における再ミエリン化が可能な病変とそうでない病変との間のバランスを知ることが治療のタイプ(炎症性作用の緩和対回復性の細胞治療)を選択する際に非常に重要である。

20

【0006】

多発性硬化症を有する患者のCNSにおいて観察される脱髄病変は、ミエリン破壊細胞(リンパ球、マクロファージ及びミクログリア)の分布並びにミエリン破壊の度合いによって、組織病理学的に3つのタイプに分類され得る(Trappら, J. Neuroimmunol., 1999年, vol. 98, 49~56ページ、Benitoら, J. Neurosci., 2007年, vol. 27, 2396~2402ページを参照)。

【0007】

1. 活動性病変: 脱髄は完了していても、未完了でもよいが、ミエリン破壊細胞でその内側が満たされており、損傷領域の至る所に均等に分布する病変。活動性病変において、再ミエリン化は可能で(実際は部分的な再ミエリン化がある、いわゆる「シャドウブランク」型である)、オリゴデンドロサイト前駆細胞を内部に有しており(従って、内部に入ることが可能である)、活動性病変は経時的な観点から最初に現れるものとして考えられる。

30

【0008】

2. 慢性病変: 脱髄が完了していて、内側にミエリン破壊細胞がない病変であり、損傷の周辺領域に集積する。慢性病変における再ミエリン化(髄鞘の修復)は極めて望み薄であり、病変の端部に限られていて、内部にオリゴデンドロサイト前駆細胞はない(内部に入るとは不可能で、もしそうすれば細胞は死滅する)。慢性病変は活動性病変後の次のステップと考えられる。

【0009】

3. 非活動性病変: 脱髄が完了していて、ミエリン破壊細胞がもはや病変の内部又は周辺のいずれにも存在しない病変。非活動性病変における再ミエリン化は実行可能でなく、内部にオリゴデンドロサイト前駆細胞も欠いていて、非活動性病変は脱髄病変の最終ステップと考えられる。

40

【0010】

多発性硬化症の炎症性環境は疾患の間ずっと連続するため、細胞治療を実施する際、成功率は損傷がもたら活動性タイプである(それ故に修復されやすい)患者において、より高いであろう。しかしながら、多発性硬化症患者のCNSに存在する損傷タイプについての唯一の信頼できる証拠は組織病理学的な解析である。明らかな理由のため、この組織病理学的解析は最も侵襲的な方法であり、ほとんど全ての場合において死後にのみ実行

50

可能な（従って有用な）ものである。核磁気共鳴により取得される画像は、今日まで現存する侵襲性がより低くより鋭敏な方法であるにもかかわらず、多発性硬化症患者の損傷タイプ、損傷の発達状態、又は白質（圧倒的多数の髄鞘が見出される）においてのみならず灰白質においても発生可能性のある、神経細胞自体へのダメージを誘因し得る損傷の発展を特定するものではない（Brexら、N. Eng. J. Med.、2002年、vol. 346、158～164ページ、Sepulchreら、Arch Neurol.、2009年、vol. 66、173～179ページ；Weiner、Ann. Neurol.、2009年、vol. 65、239～248ページ）。前述のSepulchreらの研究（Sepulchreら、Arch Neurol.、2009年、vol. 66、173～179ページ）は多発性硬化症患者における白質病変の存在と灰白質の萎縮との間の因果関係を立証するのに重要なステップであるが、Reichertらの論説（Reichertら、Arch Neurol.、2009年、vol. 66、159～160ページ）及びこれら因果関係が解析されているArchives of Neurologyの同じ巻においては、結論は「脳損傷のより鋭敏な測定が核磁気共鳴により達成されないうちは、Sepulchreらによる興味深い研究は多発性硬化症患者の脳組織の死後解析により確証されなければならない」と明確に述べられている。従って、非侵襲的な技術を用いることにより、CNSにおける病変のタイプや、白質、灰白質の両方におけるこれら病変又は発生可能性のある疾患発展の修復のためのより効率的な治療（臨床試験のデザインを包含する）を決定するのに用いられ得る（多発性硬化症患者のCSF又は血清に存在する）バイオマーカーを見出すことが必要である。

10

20

【0011】

Sarchieilliらは多発性硬化症の診断/予後においてFGF-2測定の使用を記載するが、彼らはFGF-2のレベルを疾患の臨床的変異型に関連付けるに過ぎず、病変の組織病理を研究又は言及するものではない（Neuroscience Letters 435（2008年）223～228ページ）。

【0012】

個体の脱髄病変の組織病理を知ることは極めて有用である。本発明に記載される使用及び方法により、脱髄病変は、もし個体が症状を有して、診断されることのある前に検出され得る。

【発明の説明】

30

【0013】

本発明の著者は、患者の脳脊髄液（CSF）中のFGF-2レベル及び/又はアノスミン-1レベルを通じて、患者の脳損傷の度合い、髄鞘の回復性細胞であるオリゴデンドロサイト前駆細胞の移動を可能にする又は抑制する環境、灰白質における神経ダメージに関する発生可能性の予後診断及びそれらのための適切な治療の同定（臨床試験のデザインを包含する）を理解するための新たなツールを提供する。

【0014】

本発明は従って、CSF中のFGF-2及び/又はアノスミン-1のレベルを分析するだけで多発性硬化症患者の白質における病変についての組織病理学的なカタログを作るための非侵襲的なツールを提供する。

40

【0015】

本発明の実施例で実証されるように、CSF中の分子であるFGF-2レベル及び/又はアノスミン-1レベルは、より侵襲的な検査を必要とせず又は診断の誤りなく、多発性硬化症を有する患者を包含するあらゆる神経系患者のCNS中に見出されるダメージの度合いについての唯一の信頼できる検査である生検があたかも実施されたのと同じ確実性のレベルで、多発性硬化症患者の中樞神経系（CNS）の病変タイプの1つ又は複数を反映する。FGF-2レベル及び/又はアノスミン-1レベルが対照の個体において見出されるレベルと同様である多発性硬化症患者は、多数の小さな活動性タイプの病変のみを呈する。一方、CSF中のFGF-2及び/又はアノスミン-1のレベルが対照者におけるレベルより顕著に高い（少なくとも2倍 - 2倍高い -）患者は、白質において大きな慢性又

50

は非活動性タイプの病変を呈し、その病変は前記の例におけるものよりも数が少ないが、サイズが大きい。

【0016】

さらに本発明は、CSF中のFGF-2レベル及び/又はアノスミン-1レベルが白質内の脱髄病変における髄鞘の回復性細胞の到達を可能にする又は抑制する分子環境の状態を反映することを示す。

【0017】

CSF中のFGF-2レベル及び/又はアノスミン-1レベルが対照患者において見出されるレベルと同様である患者において、活動性病変はオリゴデンドロサイト前駆細胞の運動源性化学誘引分子であるFGF-2の存在と関連している。FGF-2は病変内の特定のミクログリア/マクローファージ細胞により発現されているが、FGF-2又はその受容体のFGFR1は脱髄プラークの近傍で決して検出されない。アノスミン-1などのオリゴデンドロサイト前駆細胞の移動を妨げる又は邪魔する分子の存在は活動性病変内で検出されないが、このことは活動性病変が発生可能性のある再ミエリン化のための、従って病変の修復のための正しい状況を呈することを明確に指し示している。CSF中のFGF-2レベルが非脱髄条件におけるレベルの少なくとも2倍の高さである多発性硬化症患者の場合、慢性及び/又は非活動性の損傷は、FGF-2を発現する大量のマクローファージ/ミクログリアと、その周りのFGF-2の受容体であるFGFR1を発現するオリゴデンドロサイト前駆体の両方を組織病理学的に呈する。FGF-2は、修復されるべき脱髄領域に向けてオリゴデンドロサイト前駆体を誘引しようとする試みの中で運動源性化学誘引分子として働く。一方、このような高さのCSF中FGF-2レベルを有する多発性硬化症患者において見出される慢性及び/又は非活動性の損傷は内側に高い存在量のアノスミン-1を示すが、アノスミン-1は損傷の回復性細胞であるオリゴデンドロサイト前駆体の移動に有害(抑制性の化学忌避物質)であり、そのためオリゴデンドロサイト前駆体は内部に入ることができず、従って髄鞘修復は行われない。

10

20

【0018】

その上、多発性硬化症患者のCSF中のFGF-2レベル及び/又はアノスミン-1レベルについての測定は、細胞のレベルと灰白質の血液脳関門状態の両方についての灰白質における変化を反映し、それ故に神経ダメージの発症を予見する。

【0019】

CSF中のFGF-2及び/又はアノスミン-1のレベルが脱髄病変のない個体と同様である多発性硬化症患者において、灰白質はFGF-2又はアノスミン-1を示さず、また血液脳関門の明らかな変質も示さないが、このことは神経細胞体についてのリスクがより低いことを意味する。対照的に、CSF中のFGF-2レベル及び/又はアノスミン-1レベルが脱髄のない場合よりも顕著に高い(少なくとも2倍高い)患者は、血液脳関門が損なわれた場所において、血液脳関門を再構築しようとする試みの中で、FGF-2及びアノスミン-1を生産しそれらの共通受容体であるFGFR1をも発現する血管周囲アストロサイトを示す。血液脳関門へのダメージは、さらに上の疾患ステージで、これらの領域において神経細胞体の中に病変をもたらす。これは、より重度の運動機能ダメージや、対象の認知機能における変質さえも引き起こし得る。

30

40

【0020】

従って、CSF中のFGF-2レベル及び/又はアノスミン-1レベルの測定は、組織病理学的ダメージレベルについての、オリゴデンドロサイト前駆体を用いることによる修復への感受性についての、同様に灰白質のダメージについてのバイオマーカーとして機能を果たす。バイオマーカーは測定され得る物質で、その値が疾患を患っているか否かなどの生物学的状態に客観的に関連し得る物質である。バイオマーカーはまた治療への応答の研究においても用いられる。

【0021】

従って、本発明の第一の態様は、単離された生物学的液体サンプル中のFGF-2、アノスミン-1又は両タンパク質の量を検出することにより、発生可能性のある、脱髄疾患

50

好ましくはCNS脱髄疾患を有する個体の病変についての組織病理を予測するための、タンパク質であるFGF-2、アノスミン-1又は両タンパク質の使用に関する。

【0022】

本発明の別の好ましい実施形態において、FGF-2タンパク質及びアノスミン-1タンパク質は、単離された生物学的液体サンプル中のかかるタンパク質の量を検出することにより、発生可能性のある、脱髄疾患好ましくはCNS脱髄疾患を有する個体の病変についての組織病理を予測するのに用いられた。

【0023】

好ましい実施形態において、FGF-2タンパク質及びアノスミン-1タンパク質は、脱髄疾患を有する患者における仮説上の細胞治療の再ミエリン化バイオマーカーとして用いられた。FGF-2タンパク質及びアノスミン-1タンパク質は従って脱髄疾患と診断された患者の進展をモニターし、治療中及び治療後の進行をモニターするバイオマーカーとして機能することができるが、その理由はFGF-2タンパク質及びアノスミン-1タンパク質が患者のミエリン形成状態を指し示していることによる。患者は例えばミエリン再生を目的とする細胞治療によって治療され得るが、これに限定されるものではない。

10

【0024】

本発明の好ましい実施形態において、FGF-2タンパク質若しくはアノスミン-1タンパク質又は両タンパク質は、少なくとも1つの慢性又は非活動性の脱髄病変の存在を予測するのに用いられる。好ましい実施形態において、FGF-2タンパク質が用いられる。好ましい実施形態において、アノスミン-1タンパク質が用いられる。好ましい実施形態において、両タンパク質の組み合わせが用いられる。

20

【0025】

本発明の好ましい実施形態において、アノスミン-1タンパク質は、脱髄疾患好ましくはCNS脱髄疾患の検出のためのバイオマーカーとして用いられる。本発明の好ましい実施形態において、アノスミン-1タンパク質は単離された生物学的サンプル中で、好ましくは単離された生物学的液体中で脱髄疾患を検出するのに用いられる。

【0026】

本説明で用いられる用語「単離された生物学的液体サンプル」又は単に「生物学的サンプル」は個体の生物学的液体を言い、当業者によりその目的のために機能することが知られる任意の方法により取得されるものである。

30

【0027】

生物学的液体としては、生体から排泄又は分泌される液体、同様に正常時には排泄又は分泌されない液体を挙げることができる。生物学的液体としては、胎児を包囲する羊水、房水、腸液、リンパ液、母乳、粘液（鼻水及び痰を包含する）、唾液、皮脂（皮膚の油）、汗、尿、精液及び心嚢液を挙げることができる。単離された生物学的サンプルは例えば新鮮なもの、凍らせたもの又は固定されたものであり得るが、これらに限定されるものではない。

【0028】

好ましい実施形態において、単離された生物学的液体サンプルは任意の体液であり、好ましくはCSF、血液、血清、血漿及び涙液を包含するリストから選択される。より好ましい実施形態において、単離された生物学的液体サンプルはCSFである。

40

【0029】

本説明で用いられる用語「対象」は動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに適用される。好ましくは、本用語はCNS脱髄疾患と診断されている個体を言う。対象は従って、脱髄疾患を患う患者又は健常な個体であることができる。

【0030】

本説明で用いられる用語「CNS脱髄疾患」はCNSにおけるミエリンの喪失又は機能障害により特徴付けられる疾患を言う。

【0031】

好ましい実施形態において、脱髄疾患はCNSを冒し、多発性硬化症、デビック視神経

50

脊髄炎、急性播種性脳炎、急性横断性脊髄炎、急性又は亜急性の出血性白質脳炎、急性播種性脱髄、びまん性硬化症、脳梁の中心性脱髄、橋中心髄鞘崩壊、亜急性壊死性脊髄炎、同心円性硬化症、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、カナバン病、クラッペ病及びツェルウェーガ症候群を包含するリストから選択される。

【0032】

多発性硬化症は最も一般的なCNS脱髄疾患である。病理的知見としてはCNS白質の至る所での多発性の明確な脱髄領域が挙げられる。臨床所見としては失明、異常な外眼運動、感覚異常、麻痺、衰弱、構音障害、痙縮、運動失調及び膀胱機能障害が挙げられる。より好ましい実施形態において、CNS脱髄疾患は任意の臨床的変異型の多発性硬化症である。

10

【0033】

疾患の最も一般的な臨床的変異型は再発寛解型多発性硬化症、二次進行型多発性硬化症、一次進行型多発性硬化症、進行性再発型多発性硬化症及び臨床分離症候群(CIS)である。

【0034】

再発寛解型多発性硬化症は、神経機能障害の突発性又は急性再発性増悪、その後の部分的又は完全な回復により特徴付けられる多発性硬化症の最も一般的な臨床的変異型である。一般的な臨床所見としては視覚機能、運動機能、感覚機能又は膀胱機能の喪失が挙げられる。急性の脱髄症状の発現はCNS中のあらゆる所に起こり得るものであり、一般的に視神経、脊髄、脳、脳幹及び小脳を冒す。

20

【0035】

二次進行型多発性硬化症は再発寛解型多発性硬化症の通常臨床的経過である。突発の数及び障害の進行が減少する。

【0036】

一次進行型多発性硬化症は当初からのゆっくりとした障害の進行により特徴づけられる。患者は再発を経験しないが、疾患の発症から着実な機能的減退がある。

【0037】

最後に、進行性再発型多発性硬化症は前出の多発性硬化症よりもそれほど一般的でないが、一次進行型の経過を伴って始まり、突発を重ねる。

【0038】

なおより好ましい実施形態において、CNS脱髄疾患は多発性硬化症の一次進行型又は二次進行型の臨床的変異型である。

30

【0039】

別の好ましい実施形態において、脱髄疾患は末梢神経系(PNS)を冒し、好ましくはギラン・バレー症候群である。

【0040】

好ましい実施形態において、FGF-2及びアノスミン-1の両タンパク質は、脱髄疾患好ましくはCNS脱髄疾患の検出のためのバイオマーカーとして用いられる。好ましくは、両タンパク質のレベルは単離された生物学的サンプル中で、好ましくは単離された生物学的液体中で検出される。

40

【0041】

本発明の第二の態様は、

(a) 対象から単離された生物学的サンプル、好ましくは単離された生物学的液体を取得するステップと、

(b) ステップ(a)に記載の生物学的サンプル中のFGF-2及び/又はアノスミン-1タンパク質の量を検出するステップと、

(c) ステップ(b)で検出された量を参照量と比較するステップと

を含む、脱髄疾患の検出のために、又はCNS脱髄疾患を有する対象若しくは患者の病変の組織病理を予測するのに有用なデータを取得する方法(以後、本発明の方法)に関する。

50

【0042】

好ましい実施形態において、本発明の方法は、
(d) 個体の白質における少なくとも1つの慢性若しくは非活動性の病変の存在及び/又は灰白質における血液脳関門の変化の実存を予測するステップを含む。

【0043】

本発明の方法のステップ(b)及び/又は(c)は、例えばステップ(b)における量の検出のためのロボットセンサー機器又はステップ(c)におけるコンピューター制御された比較を通じて、全体又は部分的に自動化され得る。上のステップに加えて、追加のステップ、例えばサンプルの前処理又は本方法により取得される結果の評価に関するステップが包含されてもよい。

10

【0044】

本発明で用いられる用語「予測する」は、FGF-2及び/又はアノスミン-1タンパク質の量の分析に基づく、並びに参照量に対する検出された量の比較に基づくサンプル分類方法を用いる際の、CNSの脱髄疾患を有する対象の病変をその組織病理学的特性、例えば白質に存在する病変タイプ又は灰白質における血液脳関門の変質の実存に従って分類する能力に関する。当該分野の専門家により理解されるこの識別は、分析されるサンプルの100%において正確であることは意図されない。しかしながら、統計的に有意な数のサンプルが正確に分類されることが要求される。統計的に有意な量は、当業者により様々な統計ツールを用いることで、例えば信頼区間の決定、p値決定、スチューデント検定又はフィッシャー判別式機能により立証され得るが、これらに限定されるものではない。好ましくは、信頼区間は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%である。好ましくは、p値は0.1、0.05、0.01、0.005又は0.0001より小さい。好ましくは、本発明は分析される特定の群又は集団の対象の少なくとも60%において、少なくとも70%において、少なくとも80%において、又は少なくとも90%において疾患を正確に検出することが可能である。

20

【0045】

本説明で用いられる用語「白質」は、主としてミエリン化された神経線維から構成されるCNSの部分、より好ましくは脳の部分を言う。本説明で用いられる用語「灰白質」は、主に樹状突起及び神経細胞体から構成されていてミエリンを持たないCNSの部分、より好ましくは脳の部分を言う。

30

【0046】

線維芽細胞増殖因子-2タンパク質(FGF-2)は、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)とも呼ばれ、線維芽細胞増殖因子ファミリーに属するFGF-2遺伝子によりコードされる。FGF-2はCNSの発達、創傷修復及び腫瘍増殖などの様々な生物学的プロセスに関係している。

【0047】

本説明で用いられる用語「FGF-2タンパク質」はヒトFGF-2遺伝子(GenID: 2247)の発現から生じる任意のタンパク質を言う。FGF-2タンパク質の原型のアミノ酸配列は配列番号1(NP_001997.5)である。従って、用語「FGF-2タンパク質」はアミノ酸配列が配列番号1であるタンパク質、その変異体又はタンパク質若しくはその変異体の断片をも言うが、ただし前記変異体又は断片が機能的等価物であるという条件の下である。

40

【0048】

アノスミン-1細胞外マトリックスタンパク質は「カルマン症候群タンパク質」及び「接着分子様X連鎖性」としても知られているが、ヒト遺伝子KAL1においてコードされ、CNSの発達及び病理学的条件(カルマン症候群、がん)の両方における多様な生物学的プロセスに関わっている。

【0049】

本説明で用いられる用語「アノスミン-1タンパク質」はヒト遺伝子KAL1(Gen

50

ID : 3730) の発現から生じる任意のタンパク質を言う。アノスミン - 1 タンパク質の原型のアミノ酸配列は配列番号 2 (NP__000207.2) である。従って、用語「アノスミン - 1 タンパク質」はアミノ酸配列が配列番号 2 であるタンパク質、その変異体又はタンパク質若しくはその変異体の断片をも言うが、ただし前記変異体又は断片が機能的等価物であるという条件の下である。

【0050】

本説明において用いられる意味では、用語「変異体」は FGF - 2 タンパク質及び / 又はアノスミン - 1 タンパク質に実質的に相同であるタンパク質を言う。概して、変異体としてはアミノ酸の付加、欠失又は置換が挙げられる。用語「変異体」としてはグリコシル化、リン酸化又はメチル化などの翻訳後修飾から生じるタンパク質も挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0051】

本明細書で用いられるように、タンパク質のアミノ酸配列がアミノ酸配列の配列番号 1 及び / 又は配列番号 2 と良好に整列するとき、すなわちタンパク質のアミノ酸配列が配列番号 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 50 %、典型的には少なくとも 80 %、好都合には少なくとも 85 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 %、なおより好ましくは少なくとも 99 % の同一性の度合いを示すとき、そのタンパク質は「FGF - 2 又はアノスミン - 1 タンパク質に実質的に相同である」。

【0052】

本説明で用いられる用語「同一性」は比較されている 2 つのアミノ酸配列の間の同一なアミノ酸の割合を言う。2 つの配列間の同一性のパーセンテージは、例えば配列を比較するのに適したコンピュータープログラムの助力により、当業者により容易に同定され得る。

20

【0053】

本説明で用いられる用語「断片」は FGF - 2 タンパク質及びアノスミン - 1 タンパク質又はそれらの変異体の 1 つの一部を言う。

【0054】

本明細書で用いられる用語「機能的等価物」は当の変異体又は断片が本書類に記載される免疫学的性質を本質的に持つことを意味する。これら免疫学的性質は、本説明に付随する実施例に記載される方法などの従来の方法により決定され得る。

30

【0055】

本説明で用いられる、個体からの単離された生物学的液体サンプル中の「FGF - 2 及び / 又はアノスミン - 1 タンパク質の量を検出すること」という句は、好ましくは半定量的又は定量的な、量又は濃度の測定を言う。測定は直接的又は間接的に実施され得る。直接的な測定は FGF - 2 タンパク質及び / 又はアノスミン - 1 タンパク質の量又は濃度についての、タンパク質から直接的に取得されるシグナルに基づく測定を言い、サンプル中に存在するタンパク質分子の数と直接的に相関する。このシグナル - 強度シグナルとも言われ得る - は、例えば FGF - 2 タンパク質及び / 又はアノスミン - 1 タンパク質の化学的又は物理的性質の強度値を測定することにより、取得され得る。間接的な測定としては、二次成分 (例えば遺伝子発現産物と異なる成分など) 及び生物学的測定系 (例えば細胞応答、リガンド、「タグ」又は酵素反応産物の測定など) から取得される測定が挙げられる。

40

【0056】

本説明で用いられる用語「量」は、タンパク質の絶対量又は相対量、及びこれらに関連した又はこれらから生じることができ任意の他の値又はパラメーターを言うが、これらに限定されるものではない。かかる値又はパラメーターは、例えばイムノアッセイ、質量分析又は核磁気共鳴における強度値といった、タンパク質の物理的又は化学的性質のいずれかから直接的な測定により取得されるシグナルの強度値を含む。加えて、これらの値又はパラメーターとしては、例えば本書類の他の場所で記載される測定系のいずれかである間接的な測定により取得されるものが挙げられる。

50

【0057】

本説明で用いられる用語「比較」は、本発明の方法のステップ(a)において取得される生物学的サンプル中のFGF-2タンパク質及び/又はアノスミン-1タンパク質の量と、FGF-2タンパク質及び/又はアノスミン-1タンパク質の参照量との比較を言うが、これに限定されるものではない。本発明の方法の段落(b)に記載される比較は、コンピューターに補助されて、又は手動で実施され得る。

【0058】

本説明で用いられる用語「参照量」は、白質における少なくとも1つの慢性又は非活動性の損傷の有無及び/又は灰白質において血液脳関門が変化しているか否かによって、CNSの脱髄疾患を有する対象の損傷を分類するのに必要とされる発現産物の量を言う。

10

【0059】

参照量は、CSF中に存在するFGF-2及び/又はアノスミン-1発現量が知られていて、同様に白質又は灰白質における病変の組織病理学的な特性が知られている対象集団から、技術水準において知られる統計方法により計算され得る。CSF中に存在するFGF-2及び/又はアノスミン-1発現量の検出並びに対象集団の白質又は灰白質における病変の組織病理学的な特徴についての解析は、従来技術に記載される任意の手法によりなされ得るが、かかる手法は本説明の実施例に記載の手法を限定することなく包含する。

【0060】

好ましくは、参照量は閾値量を定義する。適切な参照量又は閾値量は、例えば同時に又は連続的に、問題の生物学的サンプルと一緒に分析され得る参照サンプルを用いることで本発明の方法により決定され得る。より好ましくは、閾値量は、対照者集団において見出される生理的な量についての正規分布の限界から得られ得る。

20

【0061】

好ましい実施形態において、本発明の方法のステップ(d)にて、ステップ(b)で検出されたFGF-2及び/又はアノスミン-1タンパク質の量がステップ(c)で比較される参照量よりも多いことは、白質における少なくとも1つの慢性若しくは非活動性の損傷及び/又は灰白質における血液脳関門変化の実存を指し示している。好ましい実施形態において、対照者におけるFGF-2の量及びアノスミン-1の量は、少なくとも1つの慢性又は非活動性の脱髄病変を有する患者において検出される平均量に対して、平均して少なくとも2倍低い。

30

【0062】

本発明の方法の好ましい実施形態において、ステップ(a)における単離された生物学的サンプルは生物学的体液であり、好ましくはCSF、血液、血清、血漿及び涙液を包含するリストから選択される。より好ましくは、サンプルはCSFである。

【0063】

本発明の方法は、好ましくは上記の脱髄疾患に関連した組織病理を検出又は予測するのに用いられる。

【0064】

好ましい実施形態において、FGF-2タンパク質及び/又はアノスミン-1タンパク質の量の検出は特異的抗体とのインキュベーションによりイムノアッセイにおいて実施された。本説明で用いられる用語「イムノアッセイ」は抗体をサンプルと組み合わせた反応に基づく任意の分析技術を言う。従来技術において知られるイムノアッセイの例は、例えばイムノプロット、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)又はタンパク質マイクロアレイであるが、これらに限定されるものではない。

40

【0065】

本報告で用いられる用語「抗体」は、免疫グロブリン分子及び免疫学的に活性のある免疫グロブリン分子の一部、すなわちFGF-2タンパク質又はアノスミン-1タンパク質と特異的に結合(免疫反応)する抗原結合部位を含有する分子を言う。免疫学的に活性のある免疫グロブリン分子の一部の例としては、抗体をペプシンなどの酵素で処理することにより生成され得るF(ab)及びF(ab')₂が挙げられる。抗体はポリクローナル

50

(典型的には異なる決定基又はエピトープに対して向けられる異なる抗体を包含する)であってもよく、又はモノクローナル(抗原内の単一の決定基に対して向けられる)であってもよい。モノクローナル抗体は遺伝的操作により生化学的に変質され得るものであり、又は合成されたものであってもよいが、このモノクローナル抗体はF G F - 2タンパク質及び/又はアノスミン - 1タンパク質の認識に必要でない部分を全体的又は部分的におそらく欠いていて、付加的な有利な性質を抗体に伝える他の部分により置換されている。抗体はまた、組換え体、キメラ、ヒト化、合成又はそれらの任意の組み合わせであってもよい。「組換え抗体又はポリペプチド(r A C)」はポリペプチドをコードする核酸で形質転換又は形質移入された宿主細胞中で生産された抗体であるか、又は相同組換えの結果として生産されるポリペプチドである。F G F - 2又はアノスミン - 1タンパク質を認識する抗体は従来技術において知られたものであり、本説明の実施例に記載される抗体などであるが、これに限定されるものではない。

10

【0066】

好ましい実施形態において、イムノアッセイはイムノプロットすなわちウエスタンプロットである。イムノプロットを実施するため、タンパク質抽出物が対象から単離された生物学的液体サンプルより取得され、タンパク質は、それらタンパク質を保持することが可能である支持媒体の中で電気泳動により分離される。分離後、タンパク質は、それらタンパク質がF G F - 2タンパク質又はアノスミン - 1タンパク質を認識する特異的抗体を用いて検出され得る異なる媒体へと移される。

【0067】

20

電気泳動は、ある一定の媒体(電気泳動バッファー)に溶解した高分子の、マトリックス又は格子支持体を通じた電場作用の結果としての運動又は移動に基づく動力学ベースの分析分離技術である。分子の挙動はその電気泳動移動度により与えられ、後者の分子の移動についてはその電荷、サイズ及び形状により与えられる。電荷/サイズが大きいほど、イオンは電場内部で早く移動する。電気泳動技術には、用いられる機器、支持体及び分離が行われる物理化学的条件の点で多くのバリエーションがある。電気泳動技術のいくつかのバリエーションとしては、例えばキャピラリー電気泳動、ろ紙電気泳動、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(P A G E)、等電点電気泳動又は二次元電気泳動(2 D - P A G E)であるが、これらに限定されるものではない。電気泳動は非変性条件又は変性条件において行われ得る。

30

【0068】

いったんタンパク質が電気泳動により分離されると、検出の前に、タンパク質は支持体又は膜へと移され、この膜としては例えばP D V F、ニトロセルロース又は酢酸セルロースがあるが、これらに限定されるものではない。膜はF G F - 2タンパク質又はアノスミン - 1タンパク質を認識する特異的抗体(一次抗体とも呼ばれる)でハイブリダイズされる。次いで膜は、一次抗体を特異的に認識可能な、マーカ化合物とコンジュゲート又は連結された抗体(二次抗体とも呼ばれる)でハイブリダイズされる。代替的な実施形態において、F G F - 2タンパク質又はアノスミン - 1タンパク質を認識するのは抗体であり、その抗体はマーカ化合物に連結又は接合されていて、その使用は二次抗体を必要としない。いったんタンパク質が検出されると、タンパク質の相対的分子サイズは、そのタンパク質の移動を、同時に好ましくは同じ媒体中で検出されるサイズが知られている対照タンパク質の移動と比較することで決定され得る。

40

【0069】

別の好ましい実施形態において、イムノアッセイは酵素結合免疫吸着測定法すなわちE L I S Aである。E L I S Aは免疫試薬(生物学的サンプルの抗原又は抗体)が固体媒体中で固定化され得るという前提に基づくもので、次いで系をマーカ化合物に結合することが可能である追加の試薬を含有する液相と接触させるものである。

【0070】

E L I S Aには異なるタイプがある。直接的なE L I S A又は単純な2層E L I S Aにおいて、固体媒体は生物学的サンプルで被覆され、そしてF G F - 2タンパク質又はアノ

50

スミン - 1 タンパク質を認識しマーカー化合物にコンジュゲート又は付着された抗体でインキュベートされる。間接的な E L I S A において、固体媒体は生物学的サンプルで被覆され、F G F - 2 タンパク質又はアノスミン - 1 タンパク質を認識する一次抗体、次いでその一次抗体を認識しマーカー化合物にコンジュゲート又は付着された二次抗体でインキュベートされる。サンドウィッチ E L I S A すなわち抗原捕捉アッセイ及び免疫複合体による検出において、第一の抗体により認識されることで F G F - 2 タンパク質又はアノスミン - 1 がウェル中に保持されるよう、ウェルは F G F - 2 タンパク質又はアノスミン - 1 を認識して結合する第一の抗体で被覆され、問題の生物学的サンプルが加えられて、次いで F G F - 2 タンパク質又はアノスミン - 1 タンパク質を認識しマーカー化合物に結合した二次抗体が加えられる。

10

【 0 0 7 1 】

別の好ましい実施形態において、イムノアッセイは、タンパク質の集合が固体媒体中に規則的に予め決められたパターンで固定化されたタンパク質マイクロアレイである。タンパク質マイクロアレイのデザインを考慮するのに重要な因子はいくつかあって、例えば固定化が起こる媒体の素質、タンパク質固定化技術、マイクロアレイの型式、用いられる捕捉剤又は検出方法などがある。本発明の第一及び第二の方法についてのこの好ましい態様を達成するのに用いられ得る異なる型式、媒体及び技術は、従来技術において知られている。

【 0 0 7 2 】

本説明で用いられる用語「マーカー化合物」は、F G F - 2 タンパク質及び / 又はアノスミン - 1 タンパク質の量についての検出及び定量化を実現させる、発色性、発蛍光性、放射性及び / 又は化学発光性のシグナルを生じることが可能な化合物を言う。マーカー化合物は放射性同位体、酵素、蛍光団、又は別の分子と組み合わせることが可能な若しくは検出され及び / 若しくは直接的に定量されることが可能な任意の分子を含むリストから選択される。マーカー化合物は直接的に、又は別の化合物を通じて抗体に結合することが可能である。直接的に結合するマーカー化合物のいくつかの例として、アルカリホスファターゼ又はペルオキシダーゼなどの酵素、 ^{33}P 又は ^{35}S などの放射性同位体、フルオレセイン又は金属粒子などの蛍光団があり、それぞれ比色分析、オートラジオグラフィ、蛍光分析又は金属組織学による直接的な検出のためのものであるが、これらに限定されるものではない。

20

30

【 0 0 7 3 】

本発明の方法の好ましい実施形態において、F G F - 2 及びアノスミン - 1 タンパク質のレベルは同じ患者又は対象からの単離された生物学的サンプル中で検出され、そして F G F - 2 及びアノスミン - 1 タンパク質のレベルは各参照レベルと比較される。F G F - 2 レベルが検出される生物学的サンプルは、アノスミン - 1 レベルが検出されるのと同じ生物学的サンプルであってもよく、異なるものであってもよい。

【 0 0 7 4 】

本発明はまた、本発明の方法を行うのに要求される情報を含むキットに関する。

【 0 0 7 5 】

従って、本発明の第三の態様は、本発明の方法についての任意の実施形態を行うためのキットに関する。

40

【 0 0 7 6 】

キットは、F G F - 2 タンパク質及び / 又はアノスミン - 1 タンパク質の量を本書類で前記される任意の方法を用いて検出するのに必要とされる全ての試薬を含むことが可能であり、これら試薬としては例えば F G F - 2 タンパク質及び / 若しくはアノスミン - 1 タンパク質に対する特異的抗体、二次抗体又は陽性及び / 若しくは陰性対照があるが、これらに限定されるものではない。キットはまた、バッファー、タンパク質抽出液、コンタミネーション防止剤、タンパク質分解阻害剤などを包含することもできるが、これらに限定されるものではない。加えて、キットはその実行及び最適化に要求される全ての媒体及び容器を包含してもよい。好ましくは、キットは本発明の方法を行うための説明書もま

50

た包含する。

【0077】

本発明で記載される方法及びキットは、CNSの脱髄疾患を有する対象の病変についての、白質における少なくとも1つの慢性又は非活動性の病変の有無に基づく分類を可能とする。本発明で記載される方法及びキットは従って、脱髄疾患を有する患者の治療（臨床試験を包含する）のタイプを選ぶのに有用であるが、その理由はCSF中のこの分子レベルが高いことはダメージの度合いがより大きいこと、従って再ミエリン化が不可能であることを指し示すためであり、この再ミエリン化は、どの供給源（自家移植、ドナーなど）であってもオリゴデンドロサイト前駆体（又は他の細胞タイプ）の移植の使用に基づく回復性細胞治療の使用を通じたものを包含する。一方、FGF-2レベル及び/又はアノスミン-1レベルが非脱髄条件において見出されるレベルと同様であることは、脱髄疾患を有する患者のCNS中の病変は再生が可能であることを指し示し、従って、より大きな成功の期待を持って、同一の個体又はドナーのオリゴデンドロサイト前駆体（及び他のタイプの細胞）の移植を用いることによってかかる修復を助ける細胞治療の使用、又は内因性オリゴデンドロサイト前駆体の増強のための薬理治療の使用が可能である。

10

【0078】

本発明で記載される方法及びキットは、CNS脱髄疾患を有する対象の病変についての、灰白質において血液脳関門の変質があるか否かによる分類を可能とする。本発明で記載される方法及びキットは従って、脱髄疾患を有する患者の、神経細胞へのダメージの可能性に向かう発展、CSF中のFGF-2及び/又はアノスミン-1のレベルが非脱髄条件において見出されるレベルより顕著に高いことが見出される場合に起こる何かを予測するために有用である。従って、患者のCSF中のFGF-2及び/又はアノスミン-1のレベル測定は、神経修復だけでなく神経保護につながる、すなわち軸索を包囲する髄鞘を修復することより神経細胞を保護することに焦点を合わせた他の治療（新たな臨床試験のデザインを包含する）の使用の基礎となるものである。

20

【0079】

本発明の態様の好ましい実施形態はFGF-2タンパク質の使用に関する。

【0080】

本発明の態様の好ましい実施形態はアノスミン-1タンパク質の使用に関する。

【0081】

本発明の態様の好ましい実施形態はFGF-2タンパク質及びアノスミン-1タンパク質の組み合わせの使用に関する。

30

【0082】

本説明及び特許請求の範囲の全体にわたって、単語「含む」及びそのバリエーションは、他の技術的特徴、添加物、成分又はステップを除外することを意図されない。当業者にとって、本発明の他の目的、利点及び特徴は本説明から部分的に推定され、本発明の実践から部分的に推定されるものであろう。以下の図及び実施例は説明として提供されるもので、本発明を限定することを意図されない。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】多発性硬化症患者のCSF中のFGF-2レベルについての対照患者のレベルとの比較は、組織病理学的なレベルで白質における脱髄プラークのタイプを示すということの説明する図である。A：対照患者及び多発性硬化症患者のCSF中のFGF-2平均レベル。「**」は $p < 0.01$ （t スチューデントt検定、又はノンパラメトリックなサンプルについてはマンホイットニー検定）である。B：FGF-2のレベルと多発性硬化症患者の白質における病変タイプとの間の相関。ピアソン相関検定によって示される相関。C～D：対照患者（C）、活動性病変を有する患者（D）及び非活動性病変を有する患者（E）の、HLA-DR（MHC-II）についての二重免疫組織化学染色及びエリオクロムシアニンのミエリン染色。図の下は、各患者のCSF中で示されるFGF-2レベル。

40

50

【図2】多発性硬化症患者のCSF中のFGF-2レベルについての測定を用いるだけで、CNS中に活動性病変のみを有する患者と少なくとも1つの慢性及び/又は非活動性病変を有する患者とを区別することが可能であるということを示す図である。A：組織切片からのタンパク質抽出物のウエスタンブロット。B：セクションAからのブロットの定量的分析は、活動性病変のみを持つ多発性硬化症患者並びに少なくとも1つの慢性及び/又は非活動性の損傷を有する多発性硬化症患者の両方が対照患者より有意に高いFGF-2のレベルを持つことを示す。一方、タンパク質抽出物中のFGF-2レベルの分析は、いずれの患者タイプ間でも差がないことを示す。C：A～Bにおいて表された同じ患者のCSF中のFGF-2レベルの分析は、多発性硬化症患者の両群の間の有意な差を示す。

【図3】対照患者におけるレベルと比較した多発性硬化症患者のCSF中のFGF-2レベルは、オリゴデンドロサイト前駆体の移動に関連した分子環境を反映するということを説明する図である。A～B：アノスミン-1についての免疫標識を持たない活動性病変を示す、HLA-DR(A)又はアノスミン-1(B)についての二重免疫組織化学染色及びエリオクロムシアニンのミエリン染色(A及びB)。C～D：エリオクロムシアニン及びHLA-DR(C)で染色される病変領域はFGF-2(D)についての免疫標識を呈しないことを示す、慢性病変を有する患者の隣接する切片。E～F：脱髄病変はアノスミン-1で満たされたように見えるということを示す、慢性病変のHLA-DR(MHC-II)についての二重免疫組織化学染色及びエリオクロムシアニンのミエリン染色(E)並びにアノスミン-1(F)についての単純な免疫組織化学染色。各パネル対の右側に、これら写真で参照された各患者のCSF中のFGF-2レベルが示される。

【図4】対照患者のレベルと比較した多発性硬化症患者のCSF中のFGF-2レベルと、灰白質における変質の存在との関係を示す図であり、両者はFGF-2及びアノスミン-1の発現並びに血液脳関門の完全性に関するものである。A～F：損傷患者におけるFGF-2及びアノスミン-1についての染色の強い増加を示す、対照患者(A、D)及び多発性硬化症を有する患者(B～C、E～F)の大脳皮質におけるFGF-2(A～C)及びアノスミン-1(D～F)についての免疫組織化学であり、血管周囲細胞に相当する。G～I：血管周囲細胞のアストロサイト的な素質を実証する、この症例における血管周囲細胞のFGF-2(G)及びGFAP(H)並びに核の対比染色を伴う両者の混合(I)についての二重蛍光免疫組織化学の例。J～O：対照患者(J～L)並びに白質における慢性及び非活動性病変を有する患者(M～O)の灰白質における、血液脳関門タンパク質ZO-1についての染色(J、M)、FGF-2と一緒に染色(K、N)、及び核の対比染色を伴うZO-1、FRF-2の2つの混合(L、O)を示す、二重蛍光免疫組織化学。血液脳関門の変質(M)はFGF-2陽性のアストロサイトの出現(N)に関連するということを示される。図の下部は、写真で参照された各患者について証明されたCSF中のFGF-2レベルを示す。

【図5-1】活動性病変のみが内側のFGF-2について免疫標識されたミクログリア/マクrophage特性を有する細胞(図5A～C)、並びにそれぞれCD68(図5D～F)及びHLA-DR(図5G～I)について二重に標識されて見える炎症性細胞を示すということを示す図である。

【図5-2】対照的に、慢性及び非活動性病変はFGF-2についてマークされた細胞を病変の内側には示さず、大半はプラーク周囲において示した(図5J～L)。同様に、二重免疫染色はこれらの細胞をHLA-DRについて免疫標識された(図5M～O)、ミクログリア/マクrophage特性を有する(図5P～R)炎症性細胞として特徴付けた。さらに、慢性又は非活動性の損傷はPDGFRで免疫標識されたオリゴデンドロサイトの前駆体(図5S)をプラーク周囲において呈したが、このことはGFAPについての免疫標識(図5U～V)ではなく、FGFR1についての免疫標識(図5T)を示す。

【実施例】

【0084】

本特許書類で提供される以下の特定の実施例は、本発明の本質を説明するのに役立つ。これら実施例は説明の目的のみのために包含され、本明細書において請求される本発明の

10

20

30

40

50

限定として解釈されるべきではない。従って下記の実施例は、特許請求の範囲を限定することなく本発明を説明するものである。

【0085】

実施例 1

本実施例において、発明者らは多発性硬化症患者のCSF中のFGF-2レベル測定は多発性硬化症患者の脳皮質において組織学的に見出される病変タイプと相関するということを実証する。

【0086】

組織とCSF両方の供給源として、様々な年齢の、異なるタイプの多発性硬化症を有する患者からのサンプルが用いられたが(表1)、全てUK Multiple Sclerosis Tissue Bank、ロンドン(英国)からのものであった。

【0087】

【表1】

表1.本研究で分析された症例の概要

患者	年齢/ 性別	診断	TP	CSF	プラー ク数	病変タイプ ¹		
						活動性	慢性	非活動性
MS40	58/F	PP	6h	√	15	11	3	
MS46	40/M	SP	18h	√	13	9	2	1
MS47	66/F	SP	17h	√	15	5		5
MS60	55/M	SP	16h	√	8	4	1	1
MS73	80/F	SP	20h	√	8	6		
MS94	42/F	PP	11h	√	10	5	3	2
MS100	46/F	SP	7h	√	14	3	5	3
MS106	39/F	SP	18h	∅	9	3	1	5
MS125	76/F	SP	13h	√	5	1	3	
MS149	82/F	SP	15h	√	8	3	3	1
MS218	56/F	SP	7h	√	15	13		
MS230	42/F	SP	31h	√	6	6		
MS249	59/F	SP	8h	∅	18	14		
MS342	35/F	SP	9h	∅	13	11	2	
CO02	95/F	Normal	10h	√				
CO08	93/F	Normal	9h	√				
CO25	35/M	Normal	22h	∅				
CO30	75/M	Normal	17h	∅				
CO41	54/M	Normal	20h	√				

CO: 対照、F: 女性、h: 時間、MS: 多発性硬化症、PP: 一次進行型、SP: 二次進行型、TP: 死後時間、M: 男性。1、√はCSFサンプルがあることを示し、∅はないことを示す。Benitoら、J. Neurosci.、2007年、vol. 27、2396~2402ページに記載された分類判断基準。

【0088】

病変の分類はHLA-DRについての二重染色及びミエリンについてのエリオクロムシアニン組織学的染色により実施された。50μm厚の組織切片は冷却源とつながれた滑走

式マイクロームを用いて取得され、回収されて使用するまで保存された。

【0089】

最初に、洗浄の後、切片はクエン酸バッファー（pH 6.0）を含有する培地中で90分で10分間浸された。続いて、内因性ペルオキシダーゼが10%メタノール及び3% H_2O_2 を含んだリン酸バッファー（0.1 M、pH 7.4）中での20分間の前処理を用いることで不活化された。切片は次いで5%（v/v）健常ウマ血清及び0.2% Triton X-100（v/v）を含んだリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4）を含有する培地中で1時間プレインキュベートされ、次いで抗HLA-DR抗体（1:200）を含んだこの同じプレインキュベーション培地中で一晩インキュベートされた（4）。免疫組織化学的検出のため抗マウス二次抗体が用いられ、その後ABC検出法及び H_2O_2 存在下でのDAB色素原が続いて用いられ、一次抗体に結合する細胞が可視化された。

10

【0090】

続いて、切片は室温で一晩、そしてさらに37℃で2時間乾燥され、その後に切片は5分間アセトン中に浸されて、室温で30分間乾燥を許された。切片はエリオクロムシアニンで1時間染色され、次いで水道水の流水中で洗浄され、その後に鑑別プロセスが次のように行われた。i) 5%鉄ミョウバン（w/v）で5分間、ii) 水道水で洗浄、及びiii) ホウ砂-フェリシアン化カリウム、それぞれ1%（w/v）及び1.25%（w/v）で10分間、顕微鏡下で色を調節。

【0091】

多発性硬化症患者のCSFは14,000 rpmで5分間、4℃で遠心分離され、感度限界が2 pg/mlのヒトFGF-2に特異的なELISAキットを用いることにより分析された。

20

【0092】

多発性硬化症患者の組織及びCSF中のFGF-2免疫検出の存在の概要は表2に記載される。対照患者は脱髄病変を示さなかった（図1A~C）。FGF-2のレベルが対照患者のレベルと同様であった多発性硬化症患者は白質のみにおいて、大量の、円形又は卵形の、MHC-IIに陽性の細胞で完全に満たされた血管周囲病変を示したが、これらの病変は全て活動性タイプとして分類された（図1A~B、D）。

【0093】

【表 2】

表2.組織及びCSF中のFGF-2の存在の間の相関

患者	病変タイプ			FGF-2免疫反応性			
	A	C	I	Ast	Per	CSF	
						pg/ml	対照に対する倍率
CO02	-	-	-	-	-	417±5	1.51±0.02
CO08	-	-	-	-	-	330±26	1.2±0.76
CO41	-	-	-	-	-	98±14	0.30±0.1
MS73	√	-	-	-	-	552±13	1.99±0.05
MS218	√	-	-	-	-	118±15	0.43±0.04
MS230	√	-	-	-	-	143±11	0.52±0.03
MS40	√	√	-	+	+	375±16	1.36±0.08
MS46	√	√	√	+	+	67±13	0.24±0.07
MS47	√	-	√	+	+	1314±38	4.76±0.1
MS60	√	√	√	+	+	3779±277	13.68±1.16
MS094	√	√	√	+	+	934±20	3.38±0.06
MS100	√	√	√	+	+	525±43	1.90±0.18
MS115	-	-	-	+	-	560±14	2.09±0.07
MS125	-	√	-	+	+	680±23	2.46±0.07
MS149	√	√	√	+	+	227±4	0.82±0.01

A：活動性病変、C：慢性病変、I：非活動性病変。√は病変の存在を示し、-は非存在を指し示す。FGF-2免疫反応性に関しては、Ast：アストロサイト、Per：プラーク周囲。+は標識が陽性であり、-は陰性であることを示す。

【0094】

CSF中のFGF-2レベルが対照患者のCSF中に存在するレベルより高かった患者は、慢性又は非活動性の病変を、両方の又は活動性タイプの病変を持つ患者であっても常に呈した(図1A~B、E)。これらの慢性又は非活動性の病変は、病変の周りのMHC-II陽性細胞により特徴付けられ、実質的にMHC-II陽性細胞が内部に存在しない(慢性病変)か、又は完全にない(非活動性病変)ものである。これらの慢性又は非活動性の病変は常に大きく、組織ブロックあたりの発生数は少なかった。さらに、何らかの種類の損傷の存在は患者の年齢($r = 0.0357$ 、 $p = 0.939$)、死後間隔($r = -0.321$ 、 $p = 0.483$)、同様に多発性硬化症のタイプに依存しなかった(表1及び2を参照)。

【0095】

実施例2

本実施例において、発明者らはCSF中のFGF-2レベルを測定することにより2つの患者群の存在が定義され得るということを実証するが、これら2群はFGF-2が組織から直接的に測定される場合(WB)には区別できないものである。タンパク質は大脳皮質の組織切片から、タンパク質抽出キットを用いて固定された組織から抽出され、FGF-2又は-チューブリン(ローディングの対照として)の存在はウエスタンブロット技術を用いて、ヤギで作られた一次ポリクローナル抗体(1:200)又はマウスで作られた一次モノクローナル抗体(1:30,000)とハイブリダイズし、その後それぞれ

ウマで作られた抗ヤギビオチン化二次抗体（1：5，000）又はウサギで作られたHRPコンジュゲートの抗マウスポリクローナル抗体とハイブリダイズして免疫検出された（図2A）。FGF-2の場合、検出はストレプトアビジン-HRPの結合により完了した。イムノプロットの定量化は、活動性病変のみを有するかかる患者と少なくとも1つの慢性及び/又は非活動性の病変を持った患者の両方が対照患者より顕著に高いFGF-2レベルを呈したことを示した（図2B）。一方、両患者群の間で統計的に有意な差は見出されなかった。タンパク質が大脳皮質から抽出されたのと同じ患者におけるCSFのELISA分析（実施例1について記載されたと同様のもの）（図2C）は、慢性及び/又は非活動性の病変を有する患者のみが活動性病変のみを有する患者及び対照患者より有意に高いFGF-2レベルを呈したことを示した。このことはCSF分析が多発性硬化症を有する患者に存在する組織病理を区別するのに適した方法であることを示したが、その理由は両タイプの患者が区別され得るためである。

【0096】

実施例3

本実施例において、発明者らは多発性硬化症患者のCSF中のFGF-2レベル及び/又はアノスミン-1レベルを測定することは白質の脱髄病変において見出される分子環境の良い生物指標であるということを実証する。

【0097】

これを検証するため、同じ組織ブロックからの同じ切片又は隣接する切片におけるFGF-2、FGFR1又はアノスミン-1についての免疫組織化学染色及びエリオクロムシアニンのミエリン染色を用いて分析された。免疫染色に用いられたプロトコールは実施例1と同じものであったが、次のバリエーションを伴った。組織におけるFGF-2又はFGFR1の免疫検出のため、ヤギで作られた異なるポリクローナル抗体（1：250 v/v）が用いられ、その後ウマで作られた抗ヤギポリクローナル抗体をビオチン化したもの（1：200）及びABC検出キットが用いられた。アノスミン-1の免疫染色のため、ウサギで作られたポリクローナル抗体（1：500）が用いられ、この抗体は後にビオチン化されたヤギで作られたポリクローナル抗体（1：200）に結合した。免疫標識のプロセスは同様であって、DAB及びH₂O₂で曝露された。

【0098】

対照患者及び多発性硬化症患者のCSF中のFGF-2検出は実施例1と同じ様式で実施された。

【0099】

対照患者は用いられた抗体のいずれについても免疫染色を示さなかった。対照レベルと同様のFGF-2レベルを有する患者は活動性病変の中又は周りにFGF-2、FGFR1又はアノスミン-1についての免疫染色を示さなかった（図3A～B）。一方、CSF中のFGF-2レベルが対照患者において検出されるレベルより顕著に高かった患者は慢性及び/又は非活動性の損傷の周りにFGF-2とFGFR1の両方についての強い免疫染色を示した（図3C～D）。加えて、各患者に存在する大きな慢性及び/又は非活動性の病変を完全に満たすことにより、強い免疫染色がアノスミン-1について観察された（図3E、F）。CSF中のFGF-2レベルが高い患者組織のいくつかにおいて見出された活動性病変は、対照者のレベルと同様のCSF中のFGF-2レベルを有する多発性硬化症患者において観察された病変との差を示さなかったが、このことはFGF-2、FGFR1及びアノスミン-1の存在は慢性又は非活動性の病変タイプに特異的であり、個体の年齢、多発性硬化症のタイプ又は死亡とサンプル採取との間の死後間隔には特異的でないことを指し示す。

【0100】

実施例4

本実施例において、発明者らは一方で活動性病変における、他方で慢性及び非活動性の病変における、FGF-2及びFGFR1産生細胞の同一性を開示する。二重組織免疫染色は、FGF-2についてのウサギポリクローナル抗体（1：200 v/v）を炎症性

10

20

30

40

50

細胞マーカー H L A - D R についての抗体 (上の実施例を参照) 及びマイクログリア / マクロファージに特異的な C D 6 8 についての抗体 (マウスで作られたモノクローナル抗体、 1 : 2 0 0) と一緒に用いることで実施された。三重免疫組織化学染色もまた F G F R 1 (ウサギで作られたポリクローナル抗体、 1 : 5 0 0 v / v)、P D G F R (ウサギで作られたポリクローナル抗体、 1 : 1 0 0 v / v) 及び G F A P (マウスで作られたモノクローナル抗体、 1 : 5 0 0 v / v) について実施された。F G F R 1 の場合、免疫蛍光はビオチン化されたヤギで作られた抗ウサギ二次抗体、A B C キット、同様にチラミド増幅キット (T S A) 及びストレプトアビジンテキサスレッド (1 : 5 0 0 v / v) を用いることにより増強された。G F A P 可視化のため、A l e x a 6 3 3 に結合したロバで作られたマウスポリクローナル抗体が用いられ、P D G F R のために A l e x a 4 8 8 に結合したロバで作られたウサギポリクローナル抗体が用いられた。加えて、核はヘキストで対比染色された。

10

【 0 1 0 1 】

結果は、活動性病変のみが、病変の内側における F G F - 2 について免疫標識されたマイクログリア / マクロファージ特性を有する細胞 (図 5 A ~ C)、並びに C D 6 8 (図 5 D ~ F) 及び H L A - D R (図 5 G ~ I) について二重に標識されて見える炎症性細胞をそれぞれ示したことを示した。対照的に、慢性及び非活動性の病変は F G F - 2 について標識された細胞を病変の内側には示さず、大半はプラーク周囲において示した (図 5 J ~ L)。同様に、二重免疫染色はこれらの細胞を H L A - D R について免疫標識された (図 5 M ~ O)、マイクログリア / マクロファージ特性を有する (図 5 P ~ R) 炎症性細胞として特徴付けた。加えて、慢性及び非活動性の病変はプラーク周囲において P D G F R で免疫標識されたオリゴデンドロサイト前駆体 (図 5 S) を呈したが、このことは G F A P についての免疫標識 (図 5 U ~ V) ではなく、F G F R 1 についての免疫標識 (図 5 T) を示した。この結果は実施例 3 に記載されたデータを確認及び拡張するもので、活動性病変のみを有する患者は細胞修復に好ましい環境を呈する一方、慢性及び / 又は非活動性の病変を有する患者は病変の内部でなく周りにかかる微小環境を示し、それ故に修復を妨げるということを示す。患者の C S F 中の F G F - 2 を測定することにより、多発性硬化症患者の普遍的な好ましい / 阻害的な環境が知られ得る。

20

【 0 1 0 2 】

実施例 5

本実施例において、発明者らは C S F 中の F G F - 2 レベルの測定は、白質における脱髄病変の存在にかかわらず、多発性硬化症患者の灰白質における変質と相関するということを示す。

30

【 0 1 0 3 】

F G F - 2、F G F R 1 及びアノスミン - 1 についての免疫染色並びにエリオクロムシアニンのミエリン染色に加えて、実施例 1 及び 3 に記載されたのと同様の方法で、二重免疫組織化学が F G F - 2 又はアノスミン - 1 及び血液脳関門の一部である閉鎖小帯に存在するタンパク質 (Z O - 1) 又はアストロサイトの典型的なマーカーであるグリア線維酸性タンパク質 (G F A P) に対して行われた。G F A P 検出はウサギで作られたポリクローナル抗体で実施され、後にこの抗体は蛍光分子に結合したロバで作られたウサギに対する二次ポリクローナル抗体に結合した。F G F - 2、F G F R 1 及びアノスミン - 1 の免疫検出のため、実施例 1 及び 3 に記載されたものと同じプロトコールが続いたが、D A B 及び H₂O₂ で曝露されること、チラミド技術を用いてシグナルを拡張すること、続いて G F A P の場合については異なる発光波長を有し、発光される蛍光から離れた蛍光分子に結合したストレプトアビジン分子を添加することは行われなかった。このプロトコールは 1 つ又は両方の色の蛍光を発する細胞の検出を実現させた。細胞外マトリックスタンパク質の特別な特性のため、アノスミン - 1 を検出するため、切片はクエン酸バッファー浴 (p H 6 . 0) を高温高压で 3 分間用いることによりエピトープをアンマスクする特定の抗原回復プロセスを受けた。

40

【 0 1 0 4 】

50

F G F - 2 又はアノスミン - 1 及び Z O - 1 に対する二重免疫組織化学の場合、前の段落に記載されたプロトコールを完了する前に、1 m g / m l (w / v) のプロテイナーゼ K でのプレインキュベーション (3 7 ° C で 1 時間) 、続いてアセトン中でのプレインキュベーション (3 0 分間、- 1 8 ° C) が処理された。Z O - 1 の検出のため、ウサギで作られたポリクローナル抗体 (1 : 1 0 0、v / v) が用いられ、この抗体は翌日に G F A P について記載されたものと同様の二次抗体に結合した。

【 0 1 0 5 】

C S F 中の F G F - 2 の測定は上に示された 3 つの実施例と同じ方法で実施された。

【 0 1 0 6 】

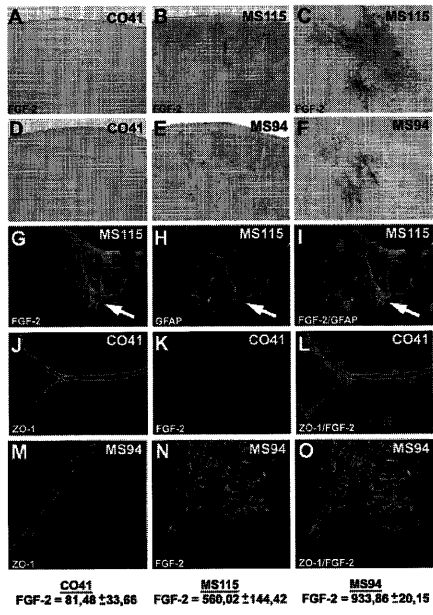
結果は、対照患者が灰白質における F G F - 2 又はアノスミン - 1 についての免疫標識 (図 4 A、D)、又は抗 Z O - 1 抗体でマークされた血液脳関門における変質 (図 4 J ~ L) を示さなかったことを明らかにした。C S F 中の F G F - 2 のレベルが対照者のレベルと同様であった多発性硬化症患者はいずれのマーカーの発現パターンにも変化を示さなかった。対照的に、C S F 中の F G F - 2 レベルが対照者のレベルよりはるかに高かった多発性硬化症患者は、F G F - 2、F G F R 1 及びアノスミン - 1 に陽性の細胞を灰白質の血管周辺に示したが (図 4 B ~ C、E ~ F)、この細胞は G F A P に対する二重免疫組織化学 (図 4 G ~ I) により血管周囲アストロサイトとして同定された。その上、これらの新しい細胞はまた、脱髄プラークのない、いわゆる正常に見える白質という組織ブロックにも存在した。血液脳関門タンパク質 Z O - 1 の発現パターン解析は、これら患者の脱髄プラークのないブロックを包含する灰白質が非連続的な、この場合は断続的で不均等に見えるパターンを示したことを示したが、このことは灰白質の血液脳関門の破損 (図 4 M ~ O) を反映する。加えて、Z O - 1 発現において見られた主要な変化は F G F - 2 陽性のアストロサイトの領域と空間的に一致したが、このことは血液脳関門の維持を達成するためのこの F G F - 2 分子のアップレギュレーションを指し示す。従って、C S F 中の F G F - 2 レベルを測定することは、脱髄が起きていない部位であっても、灰白質の血液脳関門の欠陥状態についての良い生物指標であり、将来の神経変性を回避するための予後検査として役立つことができる。

10

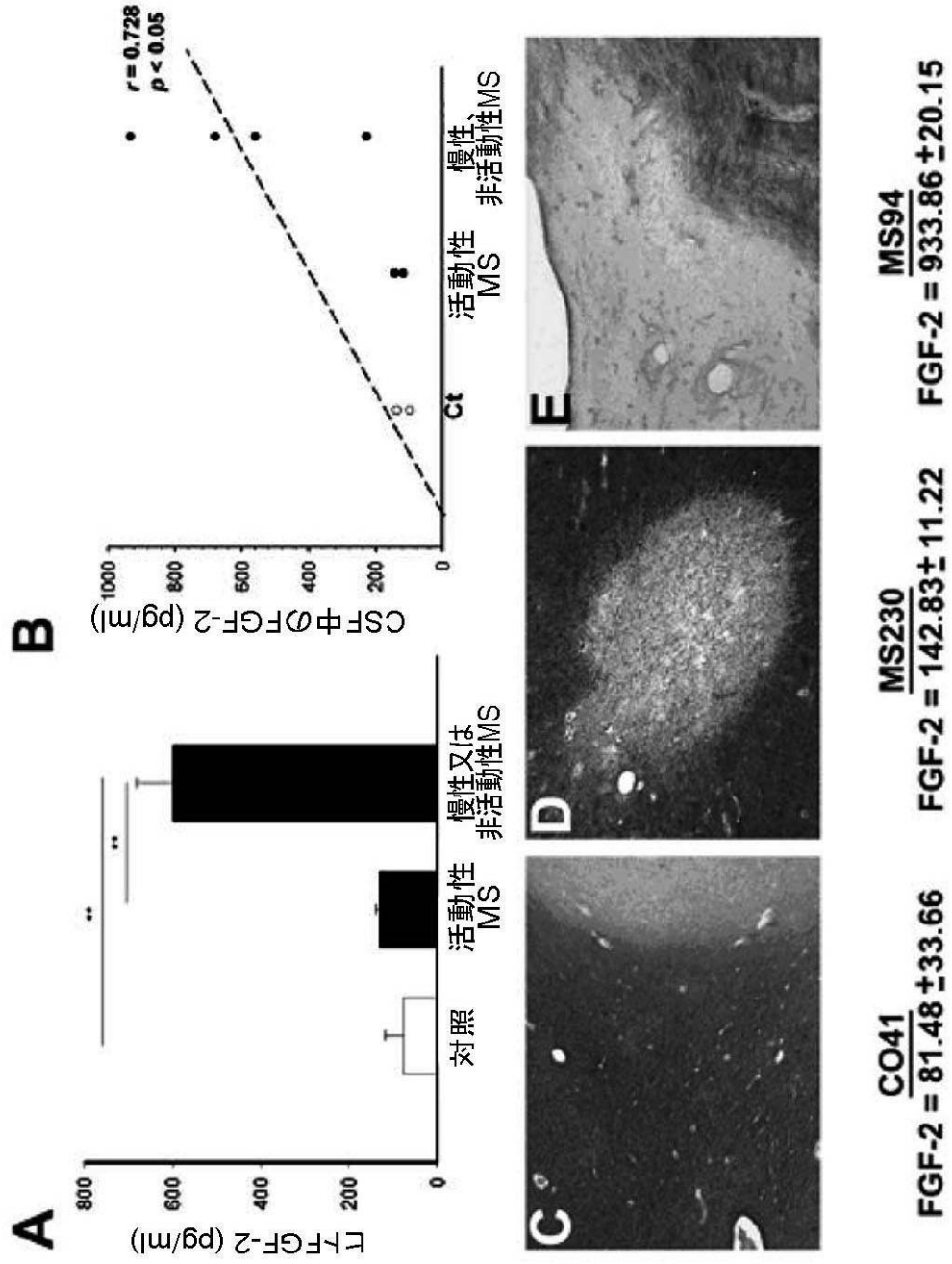
20

【 図 4 】

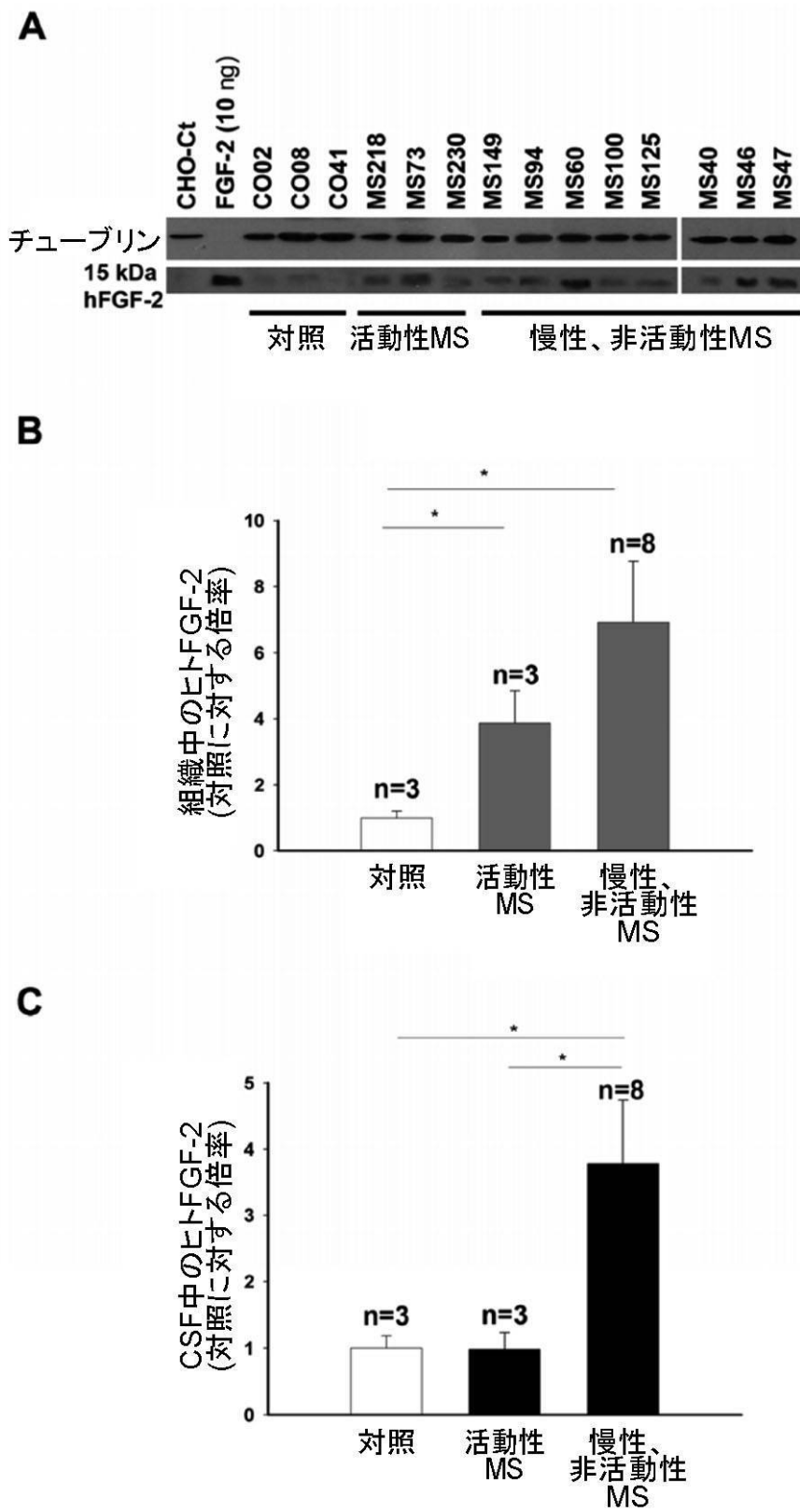
Fig. 4



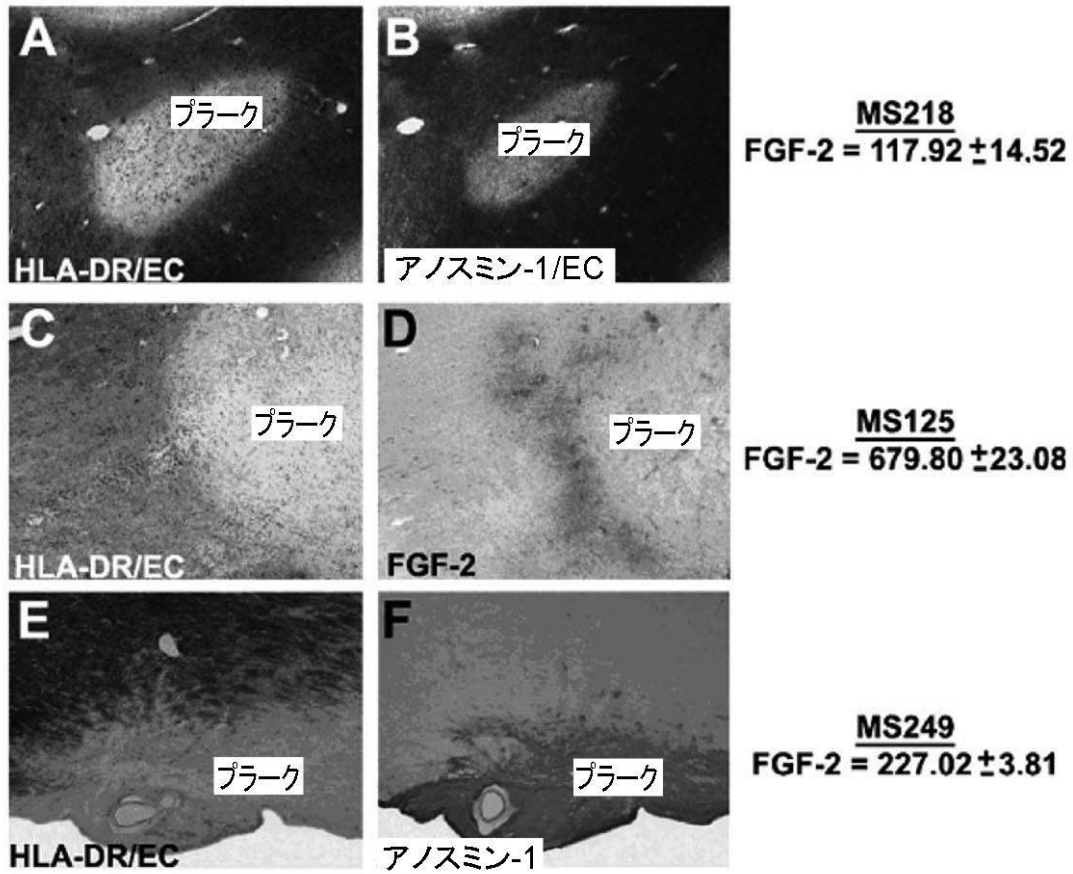
【 図 1 】



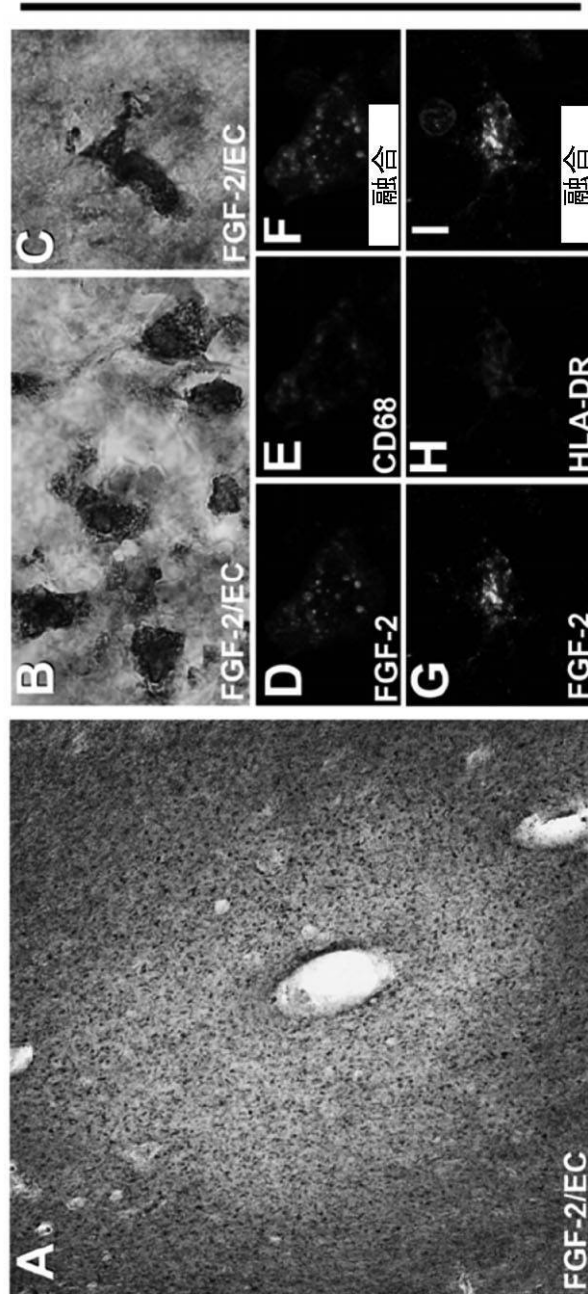
【 図 2 】



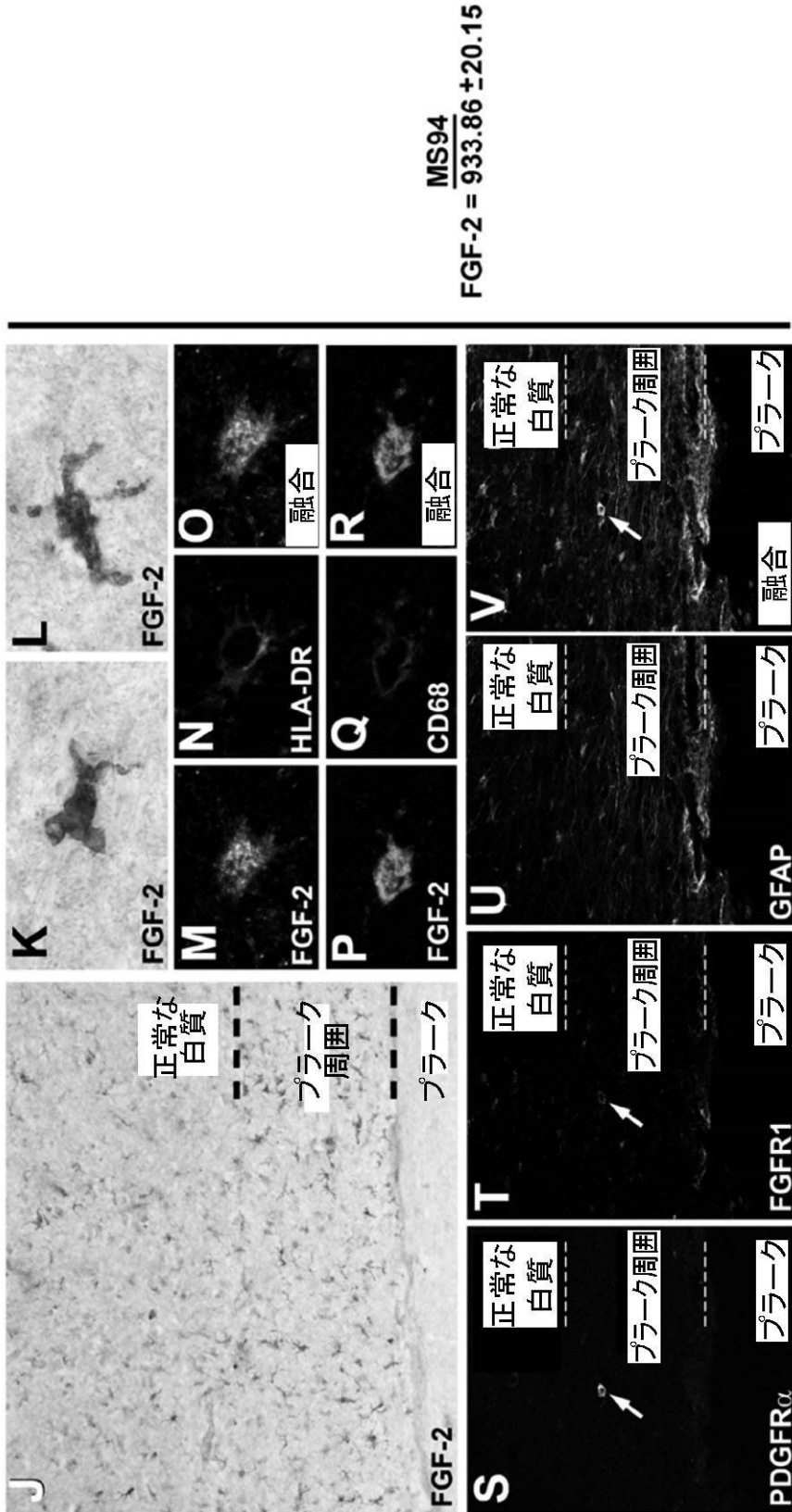
【 図 3 】



【 図 5 - 1 】



【 図 5 - 2 】



【 配列表 】
2013504075000001.app

【 国際調査報告 】

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
VERSION REVISADA

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070584

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD INV. G01N33/68 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) G01N Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	BUTT ARTHUR M ET AL: "Fibroblast growth factor 2 induces loss of adult oligodendrocytes and myelin in vivo.", EXPERIMENTAL NEUROLOGY MAR 2005 LNKD-PUBMED:15698626, vol. 192, no. 1, Marzo 2005 (2005-03), páginas 125-133, XP002618569, ISSN: 0014-4886 * resumen figura 2 <p align="center">----- -/--</p>	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos <input type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo		
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada. "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 4 de abril de 2011		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 12/04/2011
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado N° de teléfono
N° de fax		N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070584

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	<p>MESSERSMITH D J ET AL: "Fibroblast growth factor 2 (FGF2) and FGF receptor expression in an experimental demyelinating disease with extensive remyelination.", JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH 15 OCT 2000 LNKD- PUBMED:11020217, vol. 62, no 2, 15 de octubre de 2000 (2000-10-15), páginas 241-256, XP002618570, ISSN: 0360-4012 * resumen página 241, columna de derecha página 242, columna de derecha, párrafo 2 página 247, columna de derecha, párrafo pasado; figura 6</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-22
X	<p>BRIBIÁN ANA ET AL: "Anosmin-1 modulates the FGF-2-dependent migration of oligodendrocyte precursors in the developing optic nerve.", MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCES SEP 2006 LNKD- PUBMED:16876430, vol. 33, no 1, septiembre 2006 (2006-09), páginas 2-14, XP24908134, ISSN: 1044-7431 * resumen página 9, columna de derecha, párrafos 2, 3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	23-29, 32, 35-37,42
A,P	<p>GARCÍA-GONZÁLEZ DIEGO ET AL: "Dynamic roles of FGF-2 and Anosmin-1 in the migration of neuronal precursors from the subventricular zone during pre- and postnatal development.", EXPERIMENTAL NEUROLOGY APR 2010 LNKD- PUBMED:20083104, vol. 222, no 2, abril 2010 (2010-04), páginas 285-295, XP002629801, ISSN: 1090-2430 * resumen</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-42

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070584

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)	
Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2)a) por los siguientes motivos:	
1. <input type="checkbox"/>	Las reivindicaciones N°s: se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. <input type="checkbox"/>	Las reivindicaciones N°s: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. <input type="checkbox"/>	Las reivindicaciones N°s: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).
Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)	
La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:	
véase hoja adicional	
1. <input checked="" type="checkbox"/>	Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. <input type="checkbox"/>	Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. <input type="checkbox"/>	Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. <input type="checkbox"/>	Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:
Indicación en cuanto a la protesta	<input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta. <input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento. <input checked="" type="checkbox"/> El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070584

Esta Administración encargada de la búsqueda internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Reivindicaciones: 1-22 (parcialmente)

Uso de la proteína FGF-2 para predecir la histopatología de las lesiones de un sujeto con una posible enfermedad desmielinizante.

2. Reivindicaciones: 23-42 (íntegramente); 1-22 (parcialmente)

Uso de la proteína Anosmina-1, sola o en combinación con la FGF-2, para predecir la histopatología de las lesiones de un sujeto con una posible enfermedad desmielinizante.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT
REVISED VERSION**

International application No
PCT/ES2010/070584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BUTT ARTHUR M ET AL: "Fibroblast growth factor 2 induces loss of adult oligodendrocytes and myelin in vivo.", EXPERIMENTAL NEUROLOGY MAR 2005 LNKD-PUBMED:15698626, vol. 192, no. 1, March 2005 (2005-03), pages 125-133, XP002618569, ISSN: 0014-4886 * abstract figure 2 ----- -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 April 2011		Date of mailing of the international search report 12/04/2011
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 Weijland, Albert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2010/070584

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MESSERSMITH D J ET AL: "Fibroblast growth factor 2 (FGF2) and FGF receptor expression in an experimental demyelinating disease with extensive remyelination.", JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH 15 OCT 2000 LNKD- PUBMED:11020217, vol. 62, no. 2, 15 October 2000 (2000-10-15), pages 241-256, XP002618570, ISSN: 0360-4012 * abstract page 241, right-hand column page 242, right-hand column, paragraph 2 page 247, right-hand column, last paragraph; figure 6</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-22
X	<p>BRIBIÁN ANA ET AL: "Anosmin-1 modulates the FGF-2-dependent migration of oligodendrocyte precursors in the developing optic nerve.", MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCES SEP 2006 LNKD- PUBMED:16876430, vol. 33, no. 1, September 2006 (2006-09), pages 2-14, XP24908134, ISSN: 1044-7431 * abstract page 9, right-hand column, paragraphs 2, 3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	23-29, 32, 35-37,42
A,P	<p>GARCÍA-GONZÁLEZ DIEGO ET AL: "Dynamic roles of FGF-2 and Anosmin-1 in the migration of neuronal precursors from the subventricular zone during pre- and postnatal development.", EXPERIMENTAL NEUROLOGY APR 2010 LNKD- PUBMED:20083104, vol. 222, no. 2, April 2010 (2010-04), pages 285-295, XP002629801, ISSN: 1090-2430 * abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/ES2010/070584**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.:
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:

see additional sheet

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 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.:

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 Application No. PCT/ ES2010/ 070584

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-22(partially)

Use of the FGF2 protein, to predict the histopathology of the lesions of a subject with a possible demyelinating disease.

2. claims: 23-42(completely); 1-22(partially)

Use of the anomsin-1 protein alone or in combination with FGF2, to predict the histopathology of the lesions of a subject with a possible demyelinating disease

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 デ カストロ スプリエ, フェルナンド
 スペイン, トレド 45071, エス/エヌ, フィンカ ラ ペラレダ, フンダシオン
 ホスピタル ナシオナル デ パラプレジコス パラ ラ インベスティガシオン イ ラ イン
 テグラシオン (フーンパイイン)

(72)発明者 クレモント ロペス, ディエゴ
 スペイン, トレド 45071, エス/エヌ, フィンカ ラ ペラレダ, フンダシオン
 ホスピタル ナシオナル デ パラプレジコス パラ ラ インベスティガシオン イ ラ イン
 テグラシオン (フーンパイイン)

(72)発明者 オルテガ ムニョス, マリア クリスティーナ
 スペイン, トレド 45071, エス/エヌ, フィンカ ラ ペラレダ, フンダシオン
 ホスピタル ナシオナル デ パラプレジコス パラ ラ インベスティガシオン イ ラ イン
 テグラシオン (フーンパイイン)

(72)発明者 アレンサナ サナゲリコ, フランシスコ ハビエル
 スペイン, トレド 45071, エス/エヌ, フィンカ ラ ペラレダ, フンダシオン
 ホスピタル ナシオナル デ パラプレジコス パラ ラ インベスティガシオン イ ラ イン
 テグラシオン (フーンパイイン)

Fターム(参考) 4H045 BA09 CA45 DA01 DA86 EA50

专利名称(译)	用于疾病组织病理学的新型生物标志物		
公开(公告)号	JP2013504075A	公开(公告)日	2013-02-04
申请号	JP2012528396	申请日	2010-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	丰达西昂医院国立总统段线Kosupara贝丝迪加锡安艾拉的Integra锡安台风乌托邦式		
申请(专利权)人(译)	医院基金会国立Parapurejikosu对拉库存Sutiga锡安李拉的Integra西昂 (Funpaiin)		
[标]发明人	デカストロスプリエフェルナンド クレモントロベスディエゴ オルテガムニヨスマリアクリスティーナ アレンサナサナゲリコフランシスコハビエル		
发明人	デカストロスプリエ, フェルナンド クレモントロベス, ディエゴ オルテガムニヨス, マリアクリスティーナ アレンサナサナゲリコ, フランシスコハビエル		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/50 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2333/50 G01N2800/285 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/53.D C07K14/50.ZNA C07K14/47		
F-TERM分类号	4H045/BA09 4H045/CA45 4H045/DA01 4H045/DA86 4H045/EA50		
代理人(译)	池田 成人 山口和弘		
优先权	2009030661 2009-09-07 ES 2010030090 2010-01-25 ES		
其他公开文献	JP2013504075A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用检测分离的生物液体样品中FGF-2蛋白和anosmin-1蛋白的量来预测患有中枢神经系统 (CNS) 脱髓鞘疾病的患者的病变的组织病理学FGF-2蛋白和anosmin-1蛋白。本发明进一步涉及确定患有脱髓鞘CNS疾病的患者的病变的组织病理学特性的方法和用于实施所述方法的试剂盒。优选地, CNS脱髓鞘疾病是多发性硬化症, 并且生物学流体是脑脊髓液 (CSF)。【选择图】无

患者	年齢／ 性別	診断	TP	CSF	フラー ク数	病変タイプ ¹		
						活動性	慢性	非活動性
MS40	58/F	PP	6h	√	15	11	3	
MS46	40/M	SP	18h	√	13	9	2	1
MS47	66/F	SP	17h	√	15	5		5
MS60	55/M	SP	16h	√	8	4	1	1
MS73	80/F	SP	20h	√	8	6		
MS94	42/F	PP	11h	√	10	5	3	2
MS100	46/F	SP	7h	√	14	3	5	3
MS106	39/F	SP	18h	∅	9	3	1	5
MS125	76/F	SP	13h	√	5	1	3	
MS149	82/F	SP	15h	√	8	3	3	1
MS218	56/F	SP	7h	√	15	13		
MS230	42/F	SP	31h	√	6	6		
MS249	59/F	SP	8h	∅	18	14		
MS342	35/F	SP	9h	∅	13	11	2	
CO02	95/F	Normal	10h	√				
CO08	93/F	Normal	9h	√				
CO25	35/M	Normal	22h	∅				
CO30	75/M	Normal	17h	∅				
CO41	54/M	Normal	20h	√				

CO: 对照、F: 女性、h: 時間、MS: 多発性硬化症、PP: 一次進行型、SP: 二次