

(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2008-522141

(P2008-522141A)

(43) 公表日 平成20年6月26日(2008.6.26)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

F I

G O I N 33/53

テーマコード (参考)

D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2007-541985 (P2007-541985)	(71) 出願人	505303934 ユニヴァーシタ' デグリ ステュディ デ イ フィレンツェ
(86) (22) 出願日	平成17年11月24日 (2005.11.24)		イタリア国、50121 フィレンツェ、 ピアッツァ サン マルコ 4
(85) 翻訳文提出日	平成19年5月11日 (2007.5.11)	(71) 出願人	507154457 レジオネ トスカーナ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/056186		イタリア国、50129 フィレンツェ、 ヴィア カヴォウル、16-18
(87) 国際公開番号	W02006/056583	(74) 代理人	100065385 弁理士 山下 穰平
(87) 国際公開日	平成18年6月1日 (2006.6.1)	(72) 発明者	ロマグナニ・パオラ
(31) 優先権主張番号	F12004A000243		イタリア国、50139 フィレンツェ、 ヴィア ジー. バンティ 19
(32) 優先日	平成16年11月25日 (2004.11.25)		
(33) 優先権主張国	イタリア (IT)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 移植された臓器の欠損を予測するための診断方法

(57) 【要約】

移植される患者の血清における、移植前のM I Gの濃度を測定することにより、移植臓器の拒絶のリスクを確立し得る診断方法について、開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

移植前の C X C L 9 (M I G) の血清レベルを測定することで、移植された臓器の欠損を予測することを特徴とする診断方法。

【請求項 2】

移植された臓器の急性の拒絶を予測することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

移植された臓器の慢性の拒絶を予測することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記の移植された臓器は、腎臓、心臓、肝臓、骨髄、肺、膵臓又は膵島、及び腸であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 5】

前記血清レベルは、酵素免疫測定法 (E L I S A) により、測定されることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、診断に使用する血清マーカーに関する。

【背景技術】

【0002】

臓器の移植を受け入れるのに計画された主体 (s u b j e c t) の免疫反応を予測し得る新規の血清マーカーの探索は、臨床上の関心として重要な標的である。 20

【0003】

患者に対する免疫抑制治療を制御する試みにおいて現在も使用される唯一のパラメータは、反応性抗体のパネル (p a n e l o f r e a c t i v e a n t i b o d i e s ; P R A) である。

【0004】

急性及び慢性の臓器拒絶の病態において重要な役割を演じるケモカインである I P - 1 0 / C X C L 1 0 の移植前における血清レベルが増加することが異種片の欠損のリスクに厳密に関連することは、公知である (非特許文献 1) 。 30

【0005】

他の C X C R 3 のケモカインの受容体リガンドとともに、C X C L 1 0、C X C L 9 (M I G)、及び C X C L 1 1 (I - T A C) は、異種片の拒絶において、二重の生物学的役割を演じる。

【0006】

これらのケモカインは、白血球、樹状細胞、マクロファージ、及びその他の免疫細胞の移動を誘導し、且つその他の重要な炎症成分である血管形成を調節する。

【0007】

上述のケモカインの生物学的機能は、臓器の拒絶の基本である。

【非特許文献 1】Am. J. Transplant., 2004 年、4 巻、p. 1466 ~ 1474 40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

臓器の移植を行った主体の免疫反応を予知することを付与し得る血清マーカーの利用可能性が重要であることは、明らかであって、より感度を向上させ得ることが可能であれば、従前から利用されているマーカーよりも、重要である。

【課題を解決するための手段】

【0009】

ケモカインである C X C L 9 の血清レベルが上昇すると、臓器の拒絶のリスクが極端に 50

増加することを見出した。このリスクは、IP-10の血清レベルの上昇よりも、統計学的に高いものである。従って、CXCL9は、臓器移植の拒絶を予測するための最良の血清のマーカーを代表する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

その他の「娘(sister)」のケモカインであるCXCL11の血清レベルは、移植の拒絶を予測することが不可能であることを、指摘したい。

【0011】

本発明に使用する試薬及び方法は公知であって、例えば、抗CXCL9抗体を用いた、酵素免疫測定法(ELISA)が挙げられる。

10

【0012】

(実験部)

5年間の間に追跡調査した213人の被検者について、17人の健常人をコントロールとして、CXCL9及びCXCL11の移植前の血清レベルを測定した。同じ被検者において、CXCL10について、比較として、測定した。コントロールにおいて、CXCL9の血清レベルは、 52.4 ± 15.3 pg/mLであった一方で、移植された被検者では、移植前の血清レベルは、 255.6 ± 14.99 pg/mLであった。CXCL9のレベルについては、臓器を保持し続けたものと比較して、異種片を欠損した移植を受けた患者においては、より高かった(453.27 ± 61.5 対 241.7 ± 15.01)。患者の大部分において、上述のケモカインが検出し得なかったため、CXCL11は、臓器の拒絶の予測には使用し得ない結果を得た。

20

【0013】

CXCL9の血清レベルに基づいて4つのグループに分割した300人の被検者について、Kaplan-Meierに従った生存曲線を検討したところ、0~25百分率(centile)では、 121.4 pg/mL以下($n=53$)であり、25~50百分率では、 $121.4 \sim 194.3$ pg/mL($n=64$)であり、50~75百分率では、 $194.3 \sim 312.3$ pg/mL($n=53$)であり、75~100百分率では、 312.3 pg/mL以上($n=53$)であった。これらの曲線が示すのは、CXCL9の移植前のレベルに比例して、移植された臓器の5年間の間の生存が、進行的に低下するものであって、グループ1では、98.1%であり、グループ2では、100%であり、グループ3では、96.2%であり、グループ4では、79.2%であった(全体として、 $p < 0.001$ であり、グループ1対グループ4では、 $p < 0.001$ であり；グループ2対グループ4では、 $p < 0.001$ であり；グループ3対グループ4では、 $p < 0.001$ であった)。

30

【0014】

移植前におけるCXCL9のレベルの上昇(312.3 pg/mL)を伴った被検者における低下する臓器の機能の相対的なリスクを確立するため、変量に依存するものとして異種片の欠損を考慮したCoxによる多変量解析を行った。この解析において、共変量(covariables)として、被提供者の年齢及び性別、HLA-A、HLA-B及びHLA-DRのミスマッチの数、原始的な疾病、免疫抑制のタイプ、移植の数、冷虚血(cold ischemia)の時間、拒絶の数、並びに提供者の年齢及び性別について、考慮した。

40

【0015】

その結果、患者において、CXCL9の血清レベルが 312.3 pg/mLよりも大きい場合、拒絶のリスクが有意に増加することが、判明した(リスク比 10.390 ；CI、 $1.646 \sim 65.575$ ； $p = 0.013$)。

【0016】

共変量として、CXCL10を含むその他の共変量解析を行った。再び記するが、CXCL9の移植前の血清レベルが 312.3 pg/mLよりも大きい場合を、患者における臓器を欠損するリスクが増加するものと同定した(リスク比 10.433 ；CI、 1.5

50

97 ~ 68 . 146 ; $p = 0 . 01$)。その他の共変量は、C X C L 9 の不在を考慮した場合、臓器の欠損のリスクが増大するが、C X C L 9 で得られるものよりも有意に低いものであるという移植前のC X C L 10 の血清レベルを除いては、統計学的な有意性を与えなかった。上述の結果に基づくと、C X C L 9 の移植前の血清レベルは、急性及び / 又は慢性の拒絶に発展する最も高いリスクを選択することが可能となり、従って、最も高い臓器の欠損のリスクを選択することが可能となる。これらの患者は、臓器の欠損を回避するために、最も能力の高い免疫抑制療法で処置されるべきである。

【0017】

本発明による診断方法は、急性及び / 又は慢性の拒絶を予測するのに有用であり、従って、腎臓、心臓、肝臓、骨髄、肺、膵臓又は膵島、及び腸の移植における臓器の欠損を予測するのに有用である。

【手続補正書】

【提出日】平成18年9月22日(2006.9.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

移植前に上昇したC X C L 9 (M I G) の血清レベルを測定することで、移植された臓器の欠損を予測することを特徴とする診断方法。

【請求項2】

移植された臓器の急性の拒絶を予測することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

移植された臓器の慢性の拒絶を予測することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記の移植された臓器は、腎臓、心臓、肝臓、骨髄、肺、膵臓又は膵島、及び腸であることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記血清レベルは、酵素免疫測定法 (E L I S A) により、測定されることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか一項に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2005/056186

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, 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	HAUSER I A ET AL: "The ligand of CXCR3, interferon-gamma inducible CXCL9/MIG, is a highly sensitive marker of acute renal allograft rejection" NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, vol. 369, no. Suppl. 1, March 2004 (2004-03), page R147, XP008061254 & 45TH SPRING MEETING OF THE DEUTSCHE GESELLSCHAFT FUER EXPERIMENTELLE UND KLINISCHE PHARMAKOLOGIE UND; MAINZ, GERMANY; MARCH 09-11, 2004 ISSN: 0028-1298 abstract ----- -/--	1-5
<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	Date of mailing of the international search report	
16 March 2006	30/03/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Rosin, O	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/056186

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HU HUAIZHONG ET AL: "Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction." AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF TRANSPLANTATION AND THE AMERICAN SOCIETY OF TRANSPLANT SURGEONS. MAR 2004, vol. 4, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 432-437, XP002371136 ISSN: 1600-6135 abstract; figure 1; tables 1,2</p>	1
A	<p>KANMAZ TURAN ET AL: "Surveillance of acute rejection in baboon renal transplantation by elevation of interferon-gamma inducible protein-10 and monokine induced by interferon-gamma in urine." TRANSPLANTATION. 15 OCT 2004, vol. 78, no. 7, 15 October 2004 (2004-10-15), pages 1002-1007, XP002371137 ISSN: 0041-1337 abstract; figures 1,2</p>	1
A	<p>LAZZERI E ET AL: "CITOCHINE E CHEMOCHINE NELLE NEFROPATIE E NEL TRAPIANTO RENALE CYTOKINES AND CHEMOKINES IN NEPHROPATHIES AND RENAL TRANSPLANT" GIORNALE ITALIANO DI NEFROLOGIA, WICHTIG EDITORE, MILAN, IT, vol. 19, no. 6, November 2002 (2002-11), pages 641-649, XP001193775 ISSN: 0393-5590 abstract page 646, left-hand column, paragraph 3 - page 647, left-hand column, paragraph 1</p>	1
A	<p>AKALIN E ET AL: "Gene expression analysis in human renal allograft biopsy samples using high-density oligoarray technology." TRANSPLANTATION. 15 SEP 2001, vol. 72, no. 5, 15 September 2001 (2001-09-15), pages 948-953, XP002371138 ISSN: 0041-1337 abstract; figure 1; table 2</p>	1

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/056186

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WHITING D ET AL: "MIG/CXCL9 neutralization attenuates chronic rejection of transplanted hearts." JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION, vol. 22, no. 1S, January 2003 (2003-01), page S154, XP008061253 & TWENTY-THIRD ANNUAL MEETING AND SCIENTIFIC SESSIONS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HEART AND LUNG; VIENNA, AUSTRIA; APRIL 09-12, 2003 ISSN: 1053-2498 abstract</p>	1
A	<p>ZHAO DAVID XIAO-MING ET AL: "Differential expression of the IFN-gamma-inducible CXCR3-binding chemokines, IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN, and IFN-inducible T cell alpha chemoattractant in human cardiac allografts: association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 AUG 2002, vol. 169, no. 3, 1 August 2002 (2002-08-01), pages 1556-1560, XP002371139 ISSN: 0022-1767 abstract; figures 1-3; table 1</p>	1
A	<p>BERTONI E ET AL: "HIGH PRE-TRANSPLANT SERUM LEVELS OF CXCL10 PREDICT EARLY RENAL ALLOGRAFT FAILURE HOHE CXCL10-SERUMSPIEGEL VOR TRANSPLANTATION: HINWEIS AUF EIN FRUEHES TRANSPLANTATVERSAGEN NACH NIERENTRANSPLANTATION" TRANSPLANTATIONSMEDIZIN, PABST, LEMBERG, DE, vol. 15, no. 2, 2003, pages 91-96, XP008031756 ISSN: 0946-9648 page 92, right-hand column, paragraph 2 page 95, right-hand column, paragraph 1</p>	1
A	<p>ITOH Y ET AL: "Time course profile and cell-type-specific production of monokine induced by interferon-gamma in Concanavalin A-induced hepatic injury in mice: comparative study with interferon-inducible protein-10." SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY. DEC 2001, vol. 36, no. 12, December 2001 (2001-12), pages 1344-1351, XP008061422 ISSN: 0036-5521 abstract; figure 3</p>	1

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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ロトンディ・マリオ

イタリア国、80059 トッレ デル グレコ、ヴィア マルコニ、10/エイ

(72)発明者 セリオ・マリオ

イタリア国、50012 バグノ ア リポリ、ヴィア パロンセッリ、29

