

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5904953号  
(P5904953)

(45) 発行日 平成28年4月20日(2016.4.20)

(24) 登録日 平成28年3月25日(2016.3.25)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 33/48	(2006.01)
GO 1 N 33/53	(2006.01)
A 6 1 K 49/00	(2006.01)
A 6 1 K 31/7068	(2006.01)
A 6 1 K 31/519	(2006.01)
GO 1 N	33/48
GO 1 N	33/53
A 6 1 K	49/00
A 6 1 K	31/7068
A 6 1 K	31/519

請求項の数 2 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-556645 (P2012-556645)
(86) (22) 出願日	平成23年3月10日 (2011.3.10)
(65) 公表番号	特表2013-522589 (P2013-522589A)
(43) 公表日	平成25年6月13日 (2013.6.13)
(86) 國際出願番号	PCT/IL2011/000227
(87) 國際公開番号	W02011/111043
(87) 國際公開日	平成23年9月15日 (2011.9.15)
審査請求日	平成26年3月10日 (2014.3.10)
(31) 優先権主張番号	61/312,335
(32) 優先日	平成22年3月10日 (2010.3.10)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	500018608 イエダ リサーチ アンド ディベロップ メント カンパニー リミテッド イスラエル国、76100 レホボト、ピ ーオーボックス 95、ワイズマン イン スティチュート オブ サイエンス (番地 なし)
(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(74) 代理人	100156122 弁理士 佐藤 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ALS の早期診断およびALS進行のための細胞性血液マーカー

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ALSの可能性を評価する方法であって、

(i) 末梢血液試料中の細胞型ガンマ - デルタ( )T- 細胞、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup> 細胞、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup> 細胞およびCD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup> 細胞のレベルを測定し；ついで

(ii) 該細胞型の各1について測定したレベルを、対照の血液試料中の該細胞型の各1の範囲レベルを表す参照レベルと各々比較することを含み、

ここに、 T- 細胞のレベルの増大 ; CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup> 細胞のレベルの増大、 Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup> 細胞のレベルの増大、 およびCD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup> 細胞のレベルに変化がないことが、対照よりもALSの高い可能性を示すことを特徴とする該方法。 10

## 【請求項 2】

試験した個人におけるALSの可能性を診断するキットであって、

(i) ガンマ - デルタ( )T- 細胞、炎症誘発性CD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup> 単球、 およびCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup> およびLin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup> からなる細胞型のリスト；

(ii) 該細胞型の各1に対する抗体；

(iii) 該抗体を検出する試薬；

(iv) 年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型の範囲レベルを表す参照レベルのリスト； および

(v) 使用指示書

を含む該キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を早期診断するおよびALSの進行をモニターする方法、ならびに該疾患を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫系は、全組織における組織修復および再生のための身体の自然の機構である。しかしながら、中枢神経系（CNS）における末梢免疫細胞の存在および活性は望ましくないと長い間考えられてきた。CNSの免疫に特別な性質および防衛的戦闘に対する脳の低い耐性のためである（Gendelman, 2002）。さらに、炎症はCNS損傷を悪化させると考えられるが、膨大な治験において抗炎症剤は顕著な利益を示していない（Anti-inflammatory drugs fall short in Alzheimer's disease, Nat Med., 2008; Etminanら, 2008）。神経毒性を調節することにおける免疫系の役割の表されている理解（Marchettiら, 2005; Cardonaら, 2006）は、状況がそれほど単純ではなく、免疫系の有益な効果と悪い効果との間のバランスがあることを示唆している。免疫系モデルレーションに対してより焦点を当てたアプローチは、広範な抗炎症治療よりもより成功する可能性がある。

10

【0003】

「防御自己免疫」とは、ここ10年間にMichal Schwartz教授によってまとめられた概念である。傷害に応答して、自己抗原に指向されたエフェクターT-細胞（T-eff）（自己免疫T-細胞）が修復応答の一部として活性化する（Rapalinoら, 1998; Haubenら, 2000; Haubenら, 2003; SchwartzおよびHauben, 2002; Moalemら, 1999; Yolesら, 2001; Kipnisら, 2001; Schwartzら, 2003）が、この活性は自己免疫疾患を制御する機構の一部として調節性T-細胞（T-reg）（TaamsおよびAkbar, 2005）によってきっちりと調節される。CNS損傷後、損傷した組織から曝された抗原は末梢リンパ組織中のT-effを活性化する。修理の第1段階として、これらの細胞が移動して損傷した組織に特異的に向かい、そこで局所抗原を提示する細胞と相互作用して、成長因子の分泌、死滅するニューロンの排除および周囲の解毒化を生じる（Shakedら, 2004; Shakedら, 2005）。この調和のとれた免疫応答の時期、強度および期間は、細胞の生存および再生を支持する環境の能力に極めて重大に影響する（Nevoら, 2003; Schwartz, 2002）。

20

【0004】

ルー・ゲーリック病としても知られる筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、脊髄、脳幹および運動皮質における運動ニューロンの変性および細胞死から生じ、通常3-5年以内に麻痺および死に通じる神経筋の迅速な進行性の機能不全によって特徴付けられる、最も荒廃的な成人発症型の神経変性疾患である。大部分のALS症例は散発性であるが、その約5-10%は最も頻繁な突然変異がスーパーオキサイド・ジスムターゼ（SOD1）遺伝子に生じて遺伝する（Rosen, 1993）。散発および家族性形態の両方において、局所的な神経炎症および小膠細胞による細胞毒性表現型から得た証拠でもって、疾患の進行は脊髄における運動ニューロンの選択的な死に起因する（Boilleeら, 2006; Clementら, 2003; Gowingら, 2008; Beersら, 2006）；しかしながら、疾患の発病の引き金を引く因子が何であるかおよび運動ニューロン損傷の迅速な拡大にあるプロセスが何であるかは未だ明らかでない。なお、最近の証拠は、原発性の発症事象にもかかわらず、運動ニューロン損傷の進行には、悪循環の一部として神経毒性因子を生成する小膠細胞の活性化が含まれることを示唆している（Sargsyanら, 2005; MoisseおよびStrong, 2006）。ALS患者の脊髄の検屍により、変性している運動ニューロン近辺の強力な炎症誘発性の神経毒性免疫細胞プロフィールが明らかされた（Gravesら, 2004）。疾患の全ステージにおけるCNSにおける炎症応答の兆候は、（突然変異ヒトSOD1をコードするトランスジーンを運搬している）ALSのマウスおよびラットモデルにおいても記載されており；運動ニューロン傷害の臨床的兆候の開始前でさえ、小膠細胞は活性化の初期ステージにあり、IL-1のような炎症メディエーターのレ

30

40

50

ベルは高まる。症状および運動ニューロンの死の開始により、小膠細胞は慢性的に活性化されるようになり、炎症誘発性メディエーターであるTNF- $\alpha$ を生成する。

#### 【0005】

ALSにおいては、運動ニューロンの局所化グループに対する損傷を反映して損傷が局所的に開始し、ついで「局地戦のように」広がって運動ニューロンの連続する群を包含する場合がある。最近、神経毒性因子の随行する放出を有する小膠細胞の活性化を介して損傷が拡大することが示唆されている。不十分なT-細胞免疫、未制御の免疫(炎症)または、逆説的に、免疫不全の結果として「防御免疫」が失敗した場合に損傷の拡大が起こる。

#### 【発明の概要】

##### 【発明が解決しようとする課題】

10

#### 【0006】

現在、ALSの有効な治療は存在せず、そのうえ、該疾患の初期相の患者を正確に診断することは困難である。

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

##### (発明の概要)

1の態様において、本発明は、試験した個人におけるALSの可能性を診断する方法に関し、該方法は：

(i) 該個人から採取した末梢血液試料中の調節性T-細胞、ガンマ-デルタT-細胞、炎症誘発性単球、骨髄派生サプレッサー細胞またはナチュラルキラー細胞から選択される少なくとも1の細胞型のレベルを測定し；

20

(ii) 該少なくとも1の細胞型の各1について測定したレベルを、年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型の各1の範囲レベルを表す参照レベルと各々比較し、したがって年齢が一致する対照の血液試料中の該少なくとも1の細胞型の各1のレベルに対する該個人の血液試料中の該少なくとも1の細胞型の各1のレベルを表す試験プロフィールを得；ついで

(iii) 該試験プロフィールを、ALS患者における少なくとも1の細胞型の各1の代表的な相対レベルを表す参照プロフィールと比較することを含み、

ここに、該試験プロフィールと該参照プロフィールとの間の顕著な類似性が、該個人が該年齢が一致する対照よりもALSを有する高い可能性を有することを示すことを特徴とする。

30

#### 【0008】

もう1の態様において、本発明は、ALS患者におけるALSに対する治療の効力を判定する方法に関し、該方法は：

(i) 2の連続した時点(該時点の先方は該治療の前または間であり、該時点の後方は該治療の間)で該患者から採取した末梢血液試料中の調節性T-細胞、ガンマ-デルタT-細胞、骨髄派生サプレッサー細胞またはナチュラルキラー細胞から選択される少なくとも1の細胞型のレベルを測定し；ついで

(ii) 該2の時点における該少なくとも1の細胞型の各1について測定したレベルを比較することを含み、

40

ここに、健全な対照の血液試料中の該細胞型の範囲レベルを表す所定のレベルに向かう、該先方の時点に該細胞型について測定したレベルと比較した該後方の時点に該少なくとも1の細胞型の1またはそれを超えるものについて測定したレベルの変化を、該治療の効力と関連付けることを特徴とする。

#### 【0009】

さらなる態様において、本発明は、末梢血液中の骨髄派生サプレッサー細胞レベルを低下することができる有効量の剤をALS患者に投与することを含む該患者を治療する方法に関する。

#### 【0010】

いまだもう1の態様において、本発明は、ケモカインインターロイキン8(CXCL8)また

50

はケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド2(CCL2)での刺激の際に末梢血液から患者の負傷した脊髄への未成熟骨髄細胞の移動を誘導することができる有効量の剤をALS患者に投与することを含む該患者を治療する方法に関する。

#### 【0011】

いまだもう1の態様において、本発明は、有効量の自己の骨髄派生細胞をALS患者の脳脊髄液(CSF)に注射することを含む該患者を治療する方法に関する。

#### 【0012】

いまださらなる態様において、本発明は、試験した個人におけるALSの可能性を診断する；またはALS患者におけるALSの治療の効力を測定するキットを提供し、該キットは：

(i) 調節性T-細胞、ガンマ-デルタ(γδ)T-細胞、炎症誘発性単球、骨髄派生サブレッサー細胞(MDSC)またはナチュラルキラー細胞から選択される細胞型のリスト；

(ii) 該細胞型の各1に対する抗体；

(iii) 該抗体を検出する試薬；

(iv) 年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型の範囲レベルを表す参照レベルのリスト；

(v) 所望により、ALS患者の血液試料中の該細胞型の各1の代表的な相対レベルを表す参考プロフィール；および

(vi) 使用指示書

を含む。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0013】

【図1】図1は、末梢血液中のCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>骨髄派生サブレッサー細胞(MDSC)のレベルがALS患者において有意に高まっていることを示す。ALS患者、アルツハイマー病(AD)患者、年齢が一致する対照および若年対照(各々、n=7、12、10および6)の新鮮な全血試料をCD14およびCD11bに対するモノクローナル抗体で染色し、ドットはFACSによって判定した各患者についての全単球集団からのCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>細胞のパーセンテージを表す。示すように、ALS患者における全単球からのCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>細胞のパーセンテージは、年齢が一致する対照(p<0.004；スチュデントt検定)、若年対照(p<0.003；スチュデントt検定)およびアルツハイマー病患者(P<0.001；スチュデントt検定)と比較して有意に高かった。

#### 【0014】

【図2】図2は、末梢血液中のLin<sup>-</sup> / HLA - DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>MDSCのレベルがALS患者において有意に高まっていることを示す。ALS患者および年齢が一致する対照(各々、n=15および10)の新鮮な全血試料をLin、HLA - DRおよびCD33に対するモノクローナル抗体で染色し、ドットはFACSによって測定した各患者についての全単球集団からのLin<sup>-</sup> / HLA - DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>細胞のパーセンテージを表す。示すように、ALS患者における全単球のLin<sup>-</sup> / HLA - DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>骨髄細胞のパーセンテージは、年齢が一致する対照と比較して有意に高かった(p<0.02；スチュデントt検定)。

#### 【0015】

【図3】図3は、末梢血単核細胞(PBMC)中の全CD3細胞からのT細胞のパーセンテージがALS患者において有意に高まっていることを示す。ALS患者および健全な対照(各群においてn=7)の新鮮な全血試料を、CD3に対するモノクローナル抗体およびモノクローナル抗体T細胞受容体で二重染色し、ドットはFACSによって測定した全CD3細胞からのT細胞のパーセンテージを表す。示すように、ALS患者における全CD3細胞からのT細胞のパーセンテージは、健全な対照と比較して有意に高かった(p<0.004；スチュデントt検定)。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0016】

#### (発明の詳細な説明)

本発明は、疾患の病理とそれを撃退するための免疫系の試行との間の長いステージの努

10

20

30

40

50

力の後にCNSの病理が現れた概念に基づく。詳細には、この概念は、実際に、身体がガンを防ぐプロセス、すなわち、3の連続的な相「除去」、「平衡」および「回避」（「3のE」、広範なレビューについては、Dunnら，2002およびSmythら，2006を参照されたい）によって特徴付けられる「腫瘍イムノエディティング（tumor immunoediting）」といわれるプロセスに非常に類似する多段階のプロセスを記載する。

#### 【0017】

一般的に、免疫系と前発病ステージ、すなわち臨床的症状が出現する前、の罹患CNSとの間の対話についてはほとんど知られていない。したがって、免疫系の不全が起こり得る可能なステージへの洞察を得るために、本発明者らは、腫瘍との関連における免疫監視を案内する原理が神経変性疾患、特に筋萎縮性側索硬化症（ALS）にも適用可能なのかを調べた。10

#### 【0018】

除去：ここ10年以前は、一般的に、CNSの急性または慢性不調はCNS組織単独で修復されなければならず、損傷の部位における免疫細胞活性はせいぜい意味のないものであるかまたは悪くとも有毒であろうと考えられていた。本発明者らは、腫瘍イムノエディティングの削除相において、CNSにおけるホメオスタシスからのいずれかの逸脱が免疫応答のカスケードの引き金を引き、それがホメオスタシスを回復するプロセスを調和し、それによつて損傷を制限し、修復を促進することを示す。この見方によれば、逸脱が発生した直後に、種々の毒性メディエーターが出現する。その結果、局所的な先天的免疫細胞（小膠細胞）が死滅細胞および／または生理学的レベルを超えて活性化される（Schwartzら，2003；Shakedら，2004）。したがって、取り囲むいまだ健全なニューロンは、直ちに修正されない場合は、同様にしてこれらの細胞に影響する威嚇的な環境に付される（損傷の広がりとして知られている事象）。小膠細胞はケモカインを放出し、残渣および毒性の自己の化合物から損傷した部位をきれいにするように作用する。その後、損傷した組織から放出された抗原は、局所抗原提示細胞（APC）によって排出リンパ節に運ばれ、それが、代わって、損傷した部位で放出された自己抗原を特異的に認識するT細胞を活性化する（Karmanら，2004；Lingら，2006）。重要なことには、かかる自己抗原は、腫瘍における新生抗原の場合と同様に、それ自体は必ずしも病原性でないことがある。CNS - 特異的T細胞は損傷した部位に帰り、そこで、それは小膠細胞および浸潤性マクロファージのような局所APCとの相互干渉に関わる（Schoriら，2001）。このT細胞／APC相互作用の結果として、サイトカインおよびケモカインがT細胞およびAPCの両方から放出され、骨髓派生单球の第2波の浸潤を誘導する。傷害の部位でT細胞に調整された免疫環境にいまや曝されたこれらの单球は、インスリン様成長因子I（IGF-I）および脳由来神経栄養因子（BDNF）のような成長因子を生成し、それがニューロンの生存に貢献し、すなわち、損傷の広がりを防ぎ、かつ、内因性の幹細胞／始原細胞による組織修復に貢献する（Zivら，2006；Zivら，2007）。CNS傷害の原因またはホメオスタシスからの逸脱後に起こるこの一連の事象は、腫瘍免疫で観察されるものに類似する削除相を表し得る。本来、CNSにおける急性の傷害は安定な状態；グリア細胞および細胞外マトリクスプロテオグリカン、例えば、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）からなる瘢痕組織を生じ、免れさせた細胞および新たに形成したニューロンならびにグリア細胞が隔離した傷害部位の端部に存在する間、傷害の部位を閉じこめる（Rollsら，2004）。したがって、免疫系の活性が関係する限り、急性の傷害は除去相で解決される。3040

#### 【0019】

平衡：本発明者らは、慢性の神経病理学的条件の場合には、脅威を完全に除去してホメオスタシスを回復することの失敗は、その間に疾患が休止状態である、すなわち症状がない、腫瘍に対する免疫応答の平衡相に見出されるものに類似するような条件に通じる。かかる状況は、ALSのような慢性の神経変性障害において起こり得る。動物の研究はすべてのこれらの症状において、臨床的症状が発現したら、免疫活性が疾患の過程に影響することを示しているが（Butovskyら，2006；Beersら，2006；Laurieら，2007）、本発明者らは、免疫系がこれらの疾病が症候性になるずっと前にこれらの疾病的早期兆候と争つて50

いることを示す。このようにして、免疫活性はガンにおけるのと非常に似た様式で神経病理的障害を休止状態に数年間維持することができる。臨床的症状が現れる時点が、「回避」相に平行すると考え得るもののはじめを表し、それは死滅ニューロンによって課せられる免疫応答、または局所的な先天的炎症応答のいずれかの抑制の結果となり得る。

#### 【 0 0 2 0 】

回避：腫瘍イムノエディティングに対して、神経変性障害においては、免疫系は損傷を誘導する因子に対して真の選択力を課さない。この差違は、ガンにおいて免疫活性は細胞を選択的に殺すことが要求されるが、神経変性においては免疫活性は非選択的な様式で出現する脅威を除去し、細胞の生存および再生を促進することが必要であるという事実の本質的な部分である。それにもかかわらず、神経変性疾患の過程の間は、毒性メディエーター、損傷ファクターおよび死滅細胞は免疫監視を回避することができる。腫瘍エスケープにおけるのと同様に、適応免疫および圧倒的な局所炎症の両方の抑制は、神経変性プロセスの段階的拡大に通じ得る。10

#### 【 0 0 2 1 】

免疫監視からの回避が起こり得る神経変性疾患がALSであり、それは運動ニューロンに優勢的に悪影響を及ぼす。ALSの病態生理学的機構に関する知識の大部分は、ALS - 様疾患を自然に発症するトランスジェニック・マウス系統で行った実験に由来する。これらのマウスは突然変異ヒトCu<sup>2+</sup> / Zn<sup>2+</sup>スーパーオキサイド・ジスマターゼ (SOD1) タンパク質を発現し、それは家族性ALS症例の10 - 15%に対応し、全ALS症例の5 - 10%を表す。ALSマウスに対して広範な研究が行われているが、全ての組織において普遍的に発現している突然変異SOD1がどのようにして特異的な運動ニューロン変性を引き起こすのかはいまだ明らかになっていない。20

#### 【 0 0 2 2 】

ALS疾患の進行における免疫細胞の役割を裏付けるのは、ALSマウスの骨髄を健全な動物由来の骨髄で置換すると平均余命が増大することを示す幾つかの研究である (Simardら, 2006 ; Huangら, 2006 ; Cortiら, 2004)。ALS疾患進展におけるCNS - 存在小膠細胞の効果の洗練された証明は、野生型マウスからの骨髄を完全な免疫不全症も被っている新生児ALSマウスに移植した実験からきている (Beersら, 2006)。これらのマウスにおいては、新生児骨髄移植により、突然変異SOD1形を発現しない小膠細胞を有する脳のグループを生じた。この操作は、ALSマウス、すなわち突然変異SOD1を含むマウスからの骨髄移植を受けたマウスと比較した場合に、運動ニューロンの消失を鈍化させ、疾病期間および生存を延長した。重要なことに、ALSマウスから野生型マウスへの骨髄の移植は神経変性のいずれの兆候をも誘導せず、このことは小膠細胞は疾患の悪化を引き起こすようにSOD1突然変異によって悪影響を受けるが、原発性の損傷成分ではないことを示している。30

#### 【 0 0 2 3 】

大部分の研究は、毒性炎症化合物を生成することによって小膠細胞がALS進行に寄与していることを示している。イン・ビトロ (in vitro) の研究は、ALSマウスからの小膠細胞が、野生型小膠細胞と比較してリポ多糖類 (LPS) で刺激した場合に高レベルのTNF - を生成することを示している。最近の研究では、野生型SOD1ではない突然変異体が運動ニューロンから放出され、それ自体によって有害になるように小膠細胞を活性化し得ることが見出されている (Weydtら, 2004)。まとめると、ALSマウスからの知見は、少なくとも部分的には、小膠細胞表現型の変化を介して免疫監視からの回避が達成され得ることを示唆している。小膠細胞の活性化は、ALS患者の脳および脊髄ならびにALSマウスにおいて実証されている。さらに、野生型マウスに対して、15日齢もの早期のALSマウスにおいて高いレベルの単球走化性タンパク質 - 1 (MCP - 1) が見出されており；39日齢までに、CD68<sup>+</sup>細胞 (おそらく、樹状細胞) がALSマウスの脊髄において見出された (Henkelら, 2004)。これらの知見は、臨床的兆候が現れる遙か以前、寿命の非常に早期に損傷が進展し始めることを示唆している。今までのところ、免疫活性の幾つかの兆候が麻痺性の症状が現れる前に明らかであるが、骨髄派生の単球およびT細胞の顕著な浸潤は疾患の非常に後期ステージのみに起こっており (Kunis, BukshpeinおよびSchwartz, 未発表結果) 、この4050

ことは、運動ニューロンの死は、防御に必要とされる末梢骨髓派生の細胞の補充に要求される適応免疫応答の引き金を引くのに十分でないこと、またはこの応答が能動的に抑制されることを示唆している。

#### 【0024】

本発明に従って行い本明細書中で後記する予備研究は、年齢が一致する対照の末梢血液試料中で測定したものと比較した、ALS患者の末梢血液試料中のある種の骨髓派生サプレッサー細胞（MDSC）、より詳細にはCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup> およびLin<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>細胞、ならびにガンマ-デルタ（　）T-細胞の特異的かつ一貫した変化を示している。該MDSCのレベルの変化は、アルツハイマー病のような他の神経変性疾患に苦しむ個人においては観察されていない。なお、以下の表1に示すように、アルツハイマー病のような他の神経変性疾患に対して、ALS患者の血液試料中の炎症誘発性単球CD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞のレベルに変化は観察されていない。これらの知見は、前記したもののようなある種のT-細胞または単球のサブセットのレベルにおける特異的な変化を、ALSを診断するためのおよびALS進行および治療効力をモニタリングするための血液マーカーとして、単独または各々の他のマーカーもしくは他のマーカーと組合せて、用い得ることを示している。10

#### 【0025】

##### 【表1】

表1：ALSおよびアルツハイマー病患者一対一対照におけるCD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞レベル

	n	平均	SD	最小	メディアン	最大
健全な対照	14	10.5	5.78	2.40	9.7	20.4
アルツハイマー病患者	15	16.3	8.70	3.20	17.4	34.9
ALS患者	7	7.8	3.90	2.50	8.1	14.7

20

#### 【0026】

1の態様において、したがって本発明は、試験した個人におけるALSの可能性を診断する方法に関し、方法は：

(i) 該個人から採取した末梢血液試料中の調節性T-細胞、ガンマ-デルタT-細胞、炎症誘発性単球、骨髓派生サプレッサー細胞またはナチュラルキラー細胞から選択される少なくとも1の細胞型のレベルを測定し；30

(ii) 該少なくとも1の細胞型の各1について測定したレベルを、年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型の各1の範囲レベルを表す参照レベルと各々比較し、年齢が一致する対照の血液試料中の該少なくとも1の細胞型の各1のレベルに対する該個人の血液試料中の該少なくとも1の細胞型の各1のレベルを表す試験プロフィールを得；ついで

(iii) 該試験プロフィールと、ALS患者における少なくとも1の細胞型の各1の代表的な相対レベルを表す参照プロフィールとを比較することを含み、

ここに、該試験プロフィールと該参照プロフィールの間の有意な類似性が、該個人が該年齢が一致する対照よりもALSを有するより高い可能性を有することを示すことを特徴とする。40

#### 【0027】

本明細書中で用いる「調節性T-細胞」なる語句は、サプレッサーT細胞としても知られ、免疫系の活性化を抑制し、それによって免疫系のホメオスタシスおよび自己抗原に対する耐性の活性化を維持するように作用する。調節性T-細胞は、CD8貫膜糖タンパク質（CD8<sup>+</sup> T細胞）を発現するもの、CD4、CD25およびFoxP3を発現するもの（CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性T細胞）および抑制機能を有する他のT細胞型、を含む多くの形態で出現する。本発明による調節性T-細胞の非限定的な例は、CD4<sup>+</sup> / CD25<sup>+</sup> / FoxP3細胞である。

#### 【0028】

本明細書中で用いる「ガンマ-デルタ（　）T-細胞」なる語句は、その表面に異なるT細胞受容体（TCR）を所有するT細胞の小サブセットをいう。TCRが - および - TCR

40

50

鎖と称する2の糖タンパク質鎖からなる大部分のT細胞に対して、T-細胞のTCRは-鎖および-鎖から構成される。これらの細胞は、免疫監視および免疫調節において役割を果たしていることが示されており(Girardi, 2006)、IL-17の重要な起源であること(Roarkら, 2008)および強固なCD8<sup>+</sup>細胞毒性T-細胞応答を誘導すること(Brandesら, 2009)が見出された。

## 【0029】

本明細書中で用いる「炎症誘発性単球」なる語句は、CD14<sup>++</sup>単球から発達する、CD14の低レベルの発現およびCD16受容体のさらなる同時発現によって特徴付けられる非-古典型の単球(CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>単球)をいう。

## 【0030】

本明細書中で用いる「骨髓派生サプレッサー細胞(MDSC)」なる語句は、骨髓系前駆細胞および未成熟骨髓細胞(IMC)からなる細胞の不均一集団をいう。健全な個人においては、骨髓において迅速に発生したIMCは成熟顆粒球、マクロファージまたは樹状細胞(DC)に分化する。IMCから成熟骨髓細胞への分化の干渉は、MDSC集団の拡大を生じる。蓄積しつつある証拠は、MDSCがガンおよび他の疾患の間の免疫応答の負の調節に寄与することを示している。ヒトのガンにおいては、骨髓細胞のサブセットが顕著に高められたアルギナーゼ活性を有することが見出され、それは、T細胞受容体CD3-鎖の発現をダウンレギュレートし; T細胞の増殖を抑制することが見出されており、このことは、これらの細胞が腫瘍関連免疫抑制を仲介し得ることを示唆している(Ochoaら, 2007; Zeaら, 2005)。また、IL-13はMDSC抑制活性に重要な役割を果たしていることが示されているため(Beersら, 2008)、疾患の進行にMDSC活性が関与するという本発明者らによる示唆は、ALS患者の血液中のCD4<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup>の両方のT細胞のパーセンテージが健全な対照におけるよりも顕著に高いことを示す報告と一致する。CD4<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup>T細胞の比率は、ALS機能評価スケールスコアと顕著な負の相関を有することが示され、疾患進行の速度と顕著な正の相関を有することが示された(Chiuら, 2008)。

## 【0031】

本発明に係るMDSCの非限定的な例には、CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>、CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup>、Lin<sup>-</sup>/DR<sup>-</sup>、Lin<sup>-</sup>/DR<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>/CD13<sup>+</sup>、ARG<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup>/DR<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/low、およびLin<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/low/CD11b<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>細胞が含まれる。

## 【0032】

本明細書中で用いる「ナチュラルキラー(NK)細胞」なる語句は、本来の免疫系の重要なコンポーネントを構成する細胞障害性リンパ球の型をいい、標的細胞にアポトーシスを誘導するタンパク質の小さい細胞質顆粒を放出することによって、腫瘍およびウイルスに感染した細胞の拒絶において大きな役割を果たす。この細胞はTCR、Pan-TマーカーCD3または表面免疫グロブリンB細胞受容体を発現しないが、ヒトにおいては表面マーカーCD16(Fc RIII)およびCD56を通常は発現している。80%までのNK細胞はさらにCD8を発現している。本発明に係るナチュラルキラー細胞の非限定的な例には、CD16<sup>+</sup>およびCD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>細胞が含まれる。

## 【0033】

試験した末梢血液試料中の前記に定義した細胞型またはサブセットの各1のレベルは、例えば、本明細書中で後記する「材料および方法」に記載するような、当該技術分野で知られているいすれの好適な技術を利用して測定し得る。

## 【0034】

本発明の診断方法の工程(i)に従って試験した細胞型またはサブセットの各1について測定したレベルは、年齢が一致する対照、すなわち、試験した個人と同年齢グループの健全な個人のグループの範囲レベルを表す参照レベルと比較する。この範囲レベルは入手可能な医学的知識から誘導したもので、年齢が一致する対照の血液試料中の試験した特定の細胞型またはサブセットの正常な範囲レベルを表す。

## 【0035】

10

20

30

40

50

本発明の方法の工程 (ii) に従って、試験した細胞型またはサブセットの各1について測定したレベルを参照レベル、すなわち、その正常な範囲レベル、と比較した後に、年齢が一致する対照の血液試料中のこれらの細胞型またはサブセットの各1のレベルに対する、試験した個人から得た血液試料中の試験した細胞型またはサブセットの各1のレベルを各々表す。

#### 【0036】

本明細書中で用いる「試験プロフィール」なる語句は、年齢が一致する対照の血液試料中のその参照レベルに対する、試験した個人から得た血液試料中の本発明の方法に従って測定した細胞型またはサブセットの各1のレベルを示すプロフィールをいう。本発明の方法の工程 (i) に従って、少なくとも1の細胞型またはサブセットのレベルを測定し、したがって前記に定義したように、得られる試験プロフィールは少なくとも1、好ましくは2、3、4、5、6またはそれを超える細胞型またはサブセットのレベルを表す。10

#### 【0037】

測定した細胞型またはサブセットの各1の相対レベルは、「増大」と試験プロフィールに表し、これは、試験した個人から得た血液試料中の該細胞型またはサブセットのレベルが、その正常な範囲レベル、すなわち、年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型またはサブセットの範囲レベル、の上限と比較して、少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約30%、40%または50%増大していることを示し；「減少」とは、試験した個人から得た血液試料中の該細胞型またはサブセットのレベルがその正常な範囲レベルの下限と比較して、少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約30%、40%または50%低下していることを示し；「変化なし」とは、試験した個人から得た血液試料中の該細胞型またはサブセットのレベルが前記定義と増大も低下もしていない、すなわち、その正常な範囲レベル内またはそれに近いことを示す。20

#### 【0038】

試験した個人がALSを有する高い可能性を有するかを判定するために、本発明の診断方法の工程 (iii) に従って、工程 (ii) で得た試験プロフィールを、ALS患者で測定した細胞型またはサブセットの各1の代表的な相対レベルを表す参照プロフィールと比較する。本明細書中で用いる「参照プロフィール」なる語句は、これらの患者の各1からいったん得た血液試料中の細胞型またはサブセットの各1についてただちに測定したレベルに基づく、これらのALS患者から得た血液試料で測定した細胞型またはサブセットの各1の前記に定義した「増大した」、「低下した」または「変化なし」による一群のALS患者について確立した所定のプロフィールをいう。30

#### 【0039】

本発明の方法による参照プロフィールは予め決定しているが、このプロフィールはいずれの好適なアルゴリズムを用いても確立し得ることは理解されるべきである。例えば、測定したある種の細胞型またはサブセットの代表的な相対レベルは「増大した」と表され、これはグループ中のALS患者の大部分における該細胞型またはサブセットのレベルが、該細胞型またはサブセットの正常な範囲レベルと比較して増大していることを示し；「低下した」は、ALS患者の大部分における該細胞型またはサブセットのレベルが、該細胞型またはサブセットの正常な範囲レベルと比較して低下していることを示し；または、「変化なし」は、ALS患者の大部分における該細胞型またはサブセットのレベルが、前記に定義したように、該細胞型またはサブセットの正常な範囲レベルと比較して増大も低下もしていないことを示す。40

#### 【0040】

「該試験プロフィールおよび該参照プロフィールの間の顯著な類似性」なる句は、プロフィールに含まれる細胞型またはサブセットの大部分に対して試験プロフィールにおいて観察された変化のパターンがALS患者のグループについて確立した所定の参照プロフィール中のこれらの細胞型またはサブセットに対して示した変化のパターンと同じである状況をいう。実際、試験した個人がALSを有する可能性は、参照プロフィールによって定義さ50

れる方向で試験プロフィールにおいて変化するサブセットの細胞型の数の増加に従って増大すると考えられ、プロフィール間の全体の類似性は試験した個人がALSを有するという非常に高い可能性を示す。場合によっては、1または2の細胞型またはサブセットのレベルのみを測定し、試験した個人がALSを有する可能性を有するかの決定は2のプロフィール間に全体の類似性が観察される場合のみに行い得ることは理解されるべきである。

#### 【0041】

ある種の実施形態において、レベルを本発明の診断方法の工程(i)で測定する細胞型は、前記に定義した、T-細胞、炎症誘発性単球またはMDSCから選択される。

特定の実施形態において、ALS患者において測定した細胞型の各1の代表的な相対レベルを表す予め決定した参考プロフィールは、T-細胞のレベルの増大；CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup> / CD15<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup> / CD15<sup>+</sup>、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup>、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> / CD33<sup>+</sup> / CD13<sup>+</sup>、ARG<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> / Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD11b<sup>+</sup> / CD15<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / lowまたはLin<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / low / CD11b<sup>+</sup> / CD33<sup>+</sup>から選択されるMDSCの少なくとも1の型のレベルの増大；およびCD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞のレベルにおける変化なしを含む。  
10

#### 【0042】

詳細な実施形態において、ALS患者において測定した細胞型の各1の代表的な相対レベルを表す予め決定した参考プロフィールは、T-細胞のレベルの増大；CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup> / CD15<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup> / CD15<sup>+</sup>、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup>、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> / CD33<sup>+</sup> / CD13<sup>+</sup>、ARG<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> / Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD11b<sup>+</sup> / CD15<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / lowまたはLin<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / low / CD11b<sup>+</sup> / CD33<sup>+</sup>から選択されるMDSCの少なくとも1の型のレベルの増大；およびCD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞のレベルにおける変化なしを含む。  
20

#### 【0043】

より詳細な実施形態において、予め決定したプロフィールは、T-細胞のレベルの増大；CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>および/またはLin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup> MDSCのレベルの増大；所望により、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup> / CD15<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup> / CD15<sup>+</sup>、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup> / CD33<sup>+</sup> / CD13<sup>+</sup>、ARG<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> / Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD11b<sup>+</sup> / CD15<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / low、またはLin<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / low / CD11b<sup>+</sup> / CD33<sup>+</sup>から選択されるMDSCの少なくとも1、2または3のさらなる型のレベルの増大；およびCD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞のレベルにおける変化なしを含む。

#### 【0044】

ある種の詳細な実施形態において、予め決定した参考プロフィールは、T-細胞のレベルの増大；CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>およびLin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup> MDSCの両方のレベルの増大；および、CD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞のレベルにおける変化なしを含む。  
30

#### 【0045】

本明細書において後記する実施例に記載している研究においては、ALSを患っていない年齢および性別が一致する志願者の血液と比較して、ALS患者の血液にある種の免疫学的变化が認められた。詳細には、静脈血液をALS患者および対照から得、血液試料をある種の单核細胞サブセットのレベルまたは特定の膜マーカーの発現について全血フローサイトメトリーによって特徴付けた。一般的に、CD14<sup>+</sup>単球の平均パーセントは、対照およびALS血液試料中で各々 $16.6 \pm 6.3$ および $18.9 \pm 4.3$ (スチュデントt検定  $p=0.35$ )であり、すなわち、グループ間の单核細胞集団内の単球のパーセントに差異は認められなかった。しかしながら、実施例1は、年齢が一致する対照のものと比較したALS患者の血液において、膜マーカーCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>、MDSCと関連する未成熟単球表現型を発現する細胞のパーセントの劇的な上昇を示しており；実施例2は、ALS患者の血液中の全末梢血液单核細胞(PBMC)からの膜マーカーLin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>を発現する細胞のパーセントが年齢が一致する対照のものよりも顕著に高いことを示しており；実施例3は、ALS患者の血液中の全CD3細胞からのガンマ-デルタ T-細胞のパーセントが年齢が一致する対照におけるものよりも顕著に高いことを示している。  
40

#### 【0046】

ある種の具体的な実施形態において、したがって、工程(i)においてレベルを測定する細胞型は、T-細胞、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>細胞、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>細胞およびCD14<sup>+</sup> / CD

10

20

30

40

50

16<sup>+</sup>細胞であり；ALS患者における該細胞型の各1の代表的な相対レベルを表す参照プロファイルは、ガンマ-デルタT-細胞のレベルの増大、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>細胞のレベルの増大、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>細胞のレベルの増大、およびCD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞のレベルにおける変化なしを含む。

#### 【0047】

前記したもののすべてに鑑みて、本発明は、詳細には、試験した個人におけるALSの可能性を診断する方法を提供し、該方法は：

(i) 該個人から得た末梢血液試料中の細胞型、ガンマ-デルタT-細胞、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>細胞、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>細胞およびCD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞のレベルを測定し；ついで

(ii) 該細胞型の各1について測定したレベルを、各々、年齢が一致する対照の血液試料における該細胞型の各1の範囲レベルを表す参照レベルと比較することを含み、

ここに、ガンマ-デルタT-細胞のレベルの増大、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>細胞のレベルの増大、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>細胞のレベルの増大およびCD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞のレベルにおける変化なし、該個人が該年齢が一致する対照よりもALSを患っている高い可能性を有することを示すことを特徴とする。

#### 【0048】

第1の時点において進行性ALSを患っている患者の血液試料で測定したある種の細胞型またはサブセットのレベルにおいて観察された変化は、第1の時点よりも約1、2、3、4、5、6ヶ月またはそれを超えて後である第2の時点で同じ患者から採取した血液試料において測定したものよりも弱い、すなわちより顕著でないことが予想される。換言すれば、疾病的進行は試験した細胞型またはサブセットの1またはそれを超えるものについて測定したレベルに反映され、試験した細胞型またはサブセットの少なくも1について後の時点で測定したレベルと該細胞型またはサブセットの正常な範囲レベルとの間の差異は、先方の時点に該細胞型またはサブセットについて得られたものよりも顕著に大きいことが予想し得る。同様にして、第1の時点において観察された変化の少なくとも幾つかの適度は、該患者にALSに対する有効な治療処理を与えた後の時点で気付くであろうと予想し得る。

#### 【0049】

もう1の態様において、したがって本発明は、ALS患者におけるALSの治療の効力を判定するための方法に関し、該方法は：

(i) 2の連続する時点（該時点の先方は該治療の前または間であり、該時点の後方は該治療の間）において、該患者から得た末梢血液試料中の調節性T-細胞、ガンマ-デルタT-細胞、骨髓派生サプレッサー細胞またはナチュラルキラー細胞から選択される少なくとも1の細胞型のレベルを測定し；ついで

(ii) 該2の時点における該少なくとも1の細胞型の各1について測定したレベルを比較することを含み、

ここに、年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型の範囲レベルを表す参照レベルに向かう、該先方の時点において該細胞型について測定したレベルと比較した該後方の時点において該少なくとも1の細胞型の1またはそれを超えるものについて測定したレベルの変化を、該治療の効力と関連付けることを特徴とする。

#### 【0050】

試験した個人から得た血液試料中のある種の細胞型またはサブセットのレベルを年齢が一致する対照の血液試料中のその細胞型またはサブセットのレベルと比較する前記した診断方法に対して、ALS患者におけるALSの治療の効力を判定するこの方法においては、ALS患者から得た末梢血液試料中のかかる細胞型またはサブセットのレベルを2の連続する時点において測定し、ついで、疾患の進行、または、別法として該患者に与えるALS治療の効力を評価するように比較する。

#### 【0051】

本明細書中で使いる「合致した年齢の対照の血液試料中の該細胞型の範囲レベル」なる句は、前記に定義したように、年齢が一致する対照の血液試料中の特定の細胞型またはサブセットについての正常な範囲レベルをいう。

10

20

30

40

50

**【 0 0 5 2 】**

本明細書中で用いる「年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型の範囲レベル」なる句は、前記に定義した、年齢が一致する対照の血液試料中の特定の細胞型またはサブセットについての正常な範囲レベルをいう。

本明細書中で用いる「年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型の範囲レベルを表す参考レベルに向かう、該先方の時点において該細胞型について測定したレベルと比較した該後方の時点において該少なくとも1の細胞型の1またはそれを超えるものについて測定したレベルの変化」なる句は、試験した細胞型またはサブセットの少なくとも1について先方の時点において測定したレベルと該細胞型またはサブセットの正常な範囲レベルとの間の差が、該細胞型またはサブセットの正常な範囲レベルと比較した場合に、後方の時点において該細胞型またはサブセットについて得られたものよりも顕著に大きい場合をいう。該細胞型またはサブセットの正常な範囲レベルに向かう、該先方の時点においてある種の細胞型またはサブセットについて測定したレベルと比較した該後方の時点において該細胞型またはサブセットについて測定したレベルの変化は、各々前記に定義したように、先方の時点における該細胞型またはサブセットの相対レベルが「増大」によって表される場合は著しく小さい宣告した増大 (a significantly less pronounced increase) と定義し得、あるいは先方の時点における該細胞型またはサブセットの相対レベルが「低下」によって表される場合は著しく小さい宣告した低下 (a significantly less pronounced decrease) となり得る。

**【 0 0 5 3 】**

本発明の方法によれば、該先方の時点は該治療の前または間であり、該時点の後方は該治療の間である。したがって、ある種の実施形態において、該2の連続する時点の先方は該治療の前であり、該時点の後方は該治療の約1、2、3、4、5、6月またはそれを超えて後である。他の実施形態において、第2の連続する時点の先方は該治療の間の時間のいずれかの時点であり、該時点の後方は該2の時点の先方の約1、2、3、4、5、6月またはそれを超えて後である。

**【 0 0 5 4 】**

前記したように、アルツハイマー病のようなある種の神経変性疾患に対して、ALS患者の末梢血液試料中の炎症誘発性单球CD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞のレベルは、これらの細胞の正常な範囲レベルと比較して変化は認められていない。したがって、試験した個人におけるALSの可能性を診断するために、これらの单球のレベルを前記に定義した他の細胞型またはサブセットのレベルと組合せて使用し得るが、これらの特定の单球のレベルは該疾患の進行をモニタリングすることまたはALS患者におけるALSの治療の効力を判定することに重要性を有さない。

**【 0 0 5 5 】**

にもかかわらず、本発明を行い、2の連続する時点の各1において試験した種々の細胞型またはサブセットについてレベル測定したレベルが、炎症のような外部の因子によって影響されず、したがって確信をもって信頼し得ることを保証する場合には、ALS患者におけるそのレベルがその正常な範囲レベル内である少なくとも1の細胞型またはサブセットは、さらに試験し、対照として供することを推奨する。

**【 0 0 5 6 】**

ALS患者の血液中の骨髓サプレッサー細胞の細胞ルミネセントの上昇したレベルは、CNS病変の微小環境内に認められる慢性炎症と矛盾するように思える。実際には、末梢の高レベルのサプレッサー細胞の存在が、局所的にサプレッサー細胞になるものを含む血液由来单球のCNSにおける局所炎症部位への補充を抑制する。かかる单球の補充は、CNS特異的T-細胞の活性化に依存する (Shechterら, 2009)。CNSへのMDSC浸潤は悪性膠腫に苦しむ患者においてT-細胞依存であり、細胞傷害性T-細胞機能の局所阻害に通じるとも記載されている。実際、局所応答を削減する手段としての全身的な免疫活性を抑制するいずれの以前の試行も、多発性硬化症 (MS) を含む自己免疫疾患の場合のような、かかる疾患の原因としての全身炎症の場合を除いて、失敗している。例えば、MS、炎症疾患を治療するの

10

20

30

40

50

に有効であるミノサイクリンおよびデイリーCopaxone（登録商標）の両方は失敗しており、ALSにおいて有害でさえある（Gordonら，2007）。

#### 【0057】

ここに見出された全身免疫応答の免疫抑制性質は、見出された新たに形成されたT細胞における重篤な不足（Seksenyanら，2009）と結合して、ALS患者における全身免疫応答の機能不全が疾患において共存症であるという主張をさらに支持する（FreyおよびMonu，2008；Serafiniら，2006a）。前記した知見は疾患の開始および進行を説明し得る末梢と局所の免疫活性の間の欠損した連結を提供していると推論される。それに鑑みて、本発明者らは、過剰な運動活性後の脊髄の運動ニューロンの微小環境における酸素ラジカルおよび神経伝達物質、すなわちグルタメートのような毒性成分の蓄積が、ホメオスタシスの回復の最初の工程として小膠細胞を活性化することを示唆する。ALSにおいては、活性化してCNS抗原を活性化し得る新たに形成されたT-細胞の不足に起因する適応免疫系からの援助を補充することを局所炎症がせず、その結果、神経毒性炎症活性が慢性的になり組織内に広がる。慢性炎症は、MDSCのレベルを増大することが知られている状態のうちの1であり、おそらく、炎症を制御する恒常的な努力の一部である。ALS患者においては、適応免疫活性の不足は、CNSへのMDSCの浸潤の減少にもつながる。したがって、局所炎症は、適当な末梢神経保護免疫応答を呼び起こせないのみならず、MDSCの全身誘導によってそれを能動的に抑制することもできず、最終的にはついに免疫不全になる。したがって、本発明者らによる結果は、共罹患因子（co-morbidity factor）としての免疫機能における欠陥を見、したがって治療介在の潜在的な標的として免疫機ことによってALSにおける療法としての免疫回復の新たなアプローチを示唆する。

#### 【0058】

詳細には、さらなる態様において、本発明は、ALS患者を治療する方法に関し、該方法は、末梢血液中の骨髄派生サプレッサー細胞を減少することができる有効量の剤を該患者に投与することを含む。末梢血液中の骨髄派生サプレッサー細胞のレベルを低下させることができるいずれかの剤を用い得、かかる剤の例には、限定するものではないが、ゲムシタビン、シルデナフィル、タダラフィルおよびバルデナフィルが含まれる（Suzukiら，2005；Serafiniら，2006b）。

#### 【0059】

ある種の実施形態において、この治療方法は、さらに、酢酸グラチラマー（再発性・レミッティングMSの治療に認可されたCopaxone（登録商標））、自己のT細胞および/または活性化T細胞のような、末梢血液中の抗-自己T-細胞のレベルを増やすことができる有効量の剤を患者に投与することを含む。

#### 【0060】

いまだもう1の態様において、本発明は、ケモカイン・インターロイキン8（CXCL8）またはケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド2（CCL2）での刺激の際に末梢血液からALS患者の傷害した脊髄への未成熟骨髄細胞の移動を誘導することができる有効量の剤を該患者に投与することを含むALS患者を治療する方法に関する。

#### 【0061】

いまだもう1の態様において、本発明は、該患者の脳脊髄液（CSF）に有効量の自己の骨髄由来細胞を注射することを含むALS患者を治療する方法に関する。これらの細胞は、脊髄および脳の損傷部位に存在して、錯乱した炎症誘発性環境をモジュレートし、かつ、保護免疫活性の開始を高めることが必要である。

#### 【0062】

いまださらなる態様において、本発明は、試験した個人におけるALSの可能性を診断する；またはALS患者におけるALSの治療の効力を判定するキットを提供し、該キットは：

- (i) 調節性T-細胞、ガンマ-デルタ（γδ）T-細胞、炎症誘発性単球、骨髄派生サプレッサー細胞（MDSC）またはナチュラルキラー細胞から選択される細胞型のリスト；
- (ii) 該細胞型の各1に対する抗体；
- (iii) 該抗体を検出する試薬；

10

20

30

40

50

(iv) 年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型の範囲レベルを示す参照レベルのリスト；  
 (v) 所望により、ALS患者の血液試料中の該細胞型の各1の代表的な相対レベルを表す参考プロフィール；および  
 (vi) 使用指示書  
 を含む。

**【0063】**

本発明のキットは、前記した非 - 治療方法の両方、すなわち、試験した個人におけるALSの可能性を診断する方法、およびALS患者におけるALSの治療の効力を判定する方法の両方を行うために使用し得る。 10

**【0064】**

本発明のキットは、ALSについて試験した個人またはALSについて治療を受けたALS患者のいずれかから得た血液試料中のそのレベルを測定した細胞型のリストを含む。細胞型の種々のカテゴリー、すなわち、調節性T-細胞、T-細胞、炎症誘発性単球、MDSCおよびナチュラルキラー細胞は前記定義に同じである。

**【0065】**

ある種の実施形態において、リストに掲載する細胞型は、T-細胞、炎症誘発性単球、またはMDSCから選択される。詳細な実施形態において、リストの細胞型は、T-細胞；CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup> / CD15<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup> / CD15<sup>+</sup>、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup>、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> / CD33<sup>+</sup> / CD13<sup>+</sup>、ARG<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> / Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD11b<sup>+</sup> / CD15<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / low、またはLin<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / low / CD11b<sup>+</sup> / CD33<sup>+</sup>から選択されるMDSCの少なくとも1の型；および炎症誘発性CD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞である。より詳細な実施形態において、リストの細胞型は、T-細胞；CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>またはLin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>MDSCから選択されるMDSCの少なくとも1の型、好ましくはCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>およびLin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>MDSCの両方；所望により、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup> / CD15<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup> / CD15<sup>+</sup>、Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup> / CD33<sup>+</sup> / CD13<sup>+</sup>、ARG<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> / Lin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD11b<sup>+</sup> / CD15<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / lowまたはLin<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / low / CD11b<sup>+</sup> / CD33<sup>+</sup>から選択されるMDSCの少なくとも1、2、または3のさらなる型；および炎症誘発性CD14<sup>+</sup> / CD16<sup>+</sup>細胞である。 20

**【0066】**

本発明のキットは、さらに、該細胞型の各1に対する抗体、ならびにそれら抗体の検出に必要な試薬を含む。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルのいずれであってもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。提供する抗体および試薬の両方は、該血液試料中のリストした細胞型のレベルを測定するために使用する。 30

**【0067】**

本発明の非 - 治療方法の両方によって定義されるように、リストした細胞型の各1について測定したレベルを、測定したレベルが該細胞型の正常な範囲レベル、すなわち、年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型の範囲レベルよりも高いまたは低いあるいは範囲内であるかを評価するように、年齢が一致する対照の血液試料中の該細胞型の範囲レベルと比較する。

**【0068】**

前記に説明したように、個人をALSについて試験する場合、これらのデータを試験プロフィールを調製するために用い、ついでそれを、該個人が該年齢が一致する対照よりもALSを有する高い可能性を有するかを判定するように、所望によりキットに含めることができ、ALS患者の血液試料中の細胞型の各1の代表的な相対レベルを表す参照レベルと比較する。別報として、すなわち、ALS患者から採取した血液試料を試験する場合、これらのデータは、該患者に与えたALSの治療が効果的であるかを判定するように、先方または後方の時点において同一の患者から得たデータと比較し得る。 40

ここで、本発明を以下の非 - 限定的な実施例によって説明する。

**【実施例】****【0069】**

10

20

30

40

50

## 実施例

## 材料および方法

患者：患者のグループには、筋萎縮性側索硬化症（ALS）に苦しむと臨床的に診断され、インフォームド・コンセントに同意して署名した男性および女性の両方の個人を含ませた。対照グループには、ALSの臨床的症状を有さず、インフォームド・コンセントに同意して署名した男性および女性の志願者を含ませた。

## 【0070】

全血FACS染色：50 μl の全血試料を5 μl の各指定したmAb（下記参照）と4にて45分間インキュベートした。2mlのFACSlyse（Becton Dickinson, San Jose, CA）を各チューブに添加し、ついでそのチューブを室温にて12分間インキュベートし、つづいて2mlのPBSで洗浄した。各試料からは、 $10^5$ 事象をFACSCalibur（Becton Dickinson, San Jose, CA）によって獲得し、FCS Express V3ソフトウェアによって分析した。  
10

## 【0071】

指定したモノクローナル抗体（mAb）：CD3、CD4、CD8、CD14、CD15、CD11b、CD16、Lin、HLA-DR、CD33、TCRgd-Becton Dickinson, San Jose, CA. TLR4 eBioscience San Diego CA。

## 【0072】

実施例1 ALS患者は、アルツハイマー患者および健全な対照と比較してPBMC中の上昇したレベルのCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>細胞を示す

骨髓サプレッサー細胞は、潜在的な免疫抑制機能を有する未成熟骨髓細胞の集団を構成する。この細胞は実験動物およびヒトのガン患者において腫瘍に浸潤し、ガン細胞に対する適応免疫応答を調整することが示されている。それは、正常、炎症または外科手術／外傷性ストレス障害下で免疫抑制を誘導し得る。骨髓サプレッサー細胞の蓄積は、腫瘍エスケープの主な機構の1である（Frey, 2006 ; Serafiniら, 2006a ; Buntら, 2006 ; Makarenkovaら, 2006）。骨髓サプレッサー細胞は、それが種々の機構によってT-細胞免疫応答を抑制する能力を有するため関心がある（SicaおよびBronte, 2007 ; Serafiniら, 2006a ; Talmadge, 2007 ; NagarajおよびGabrilovich, 2007）。この細胞は、マクロファージ、顆粒球、未成熟樹状細胞および早期骨髓前駆体を含む不均一な細胞集団である。  
20

## 【0073】

本研究においては、ALS患者の血液中のCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>骨髓由来サプレッサー細胞（MDSC）を、年齢が一致する対照および成人（年齢20 - 50歳）の対照のものと比較した。詳細には、ALS患者、アルツハイマー患者、年齢が一致する対照および成人対照（各々、n=7, 12、10および6）をCD14およびCD11bに対するモノクローナル抗体で染色し；総単球の中からCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>細胞のパーセントをFACSによって測定した。図1に示すように、ALS患者における総単球の中からのCD11b<sup>+</sup> / CD14<sup>-</sup>細胞のパーセンテージは、年齢が一致する対照、若年対照およびアルツハイマー病患者と比較して顕著に高かった。ALS患者の末梢血液に見出された骨髓サプレッサー細胞の上昇したレベルは、修復T-細胞免疫応答を制限し、したがって、小膠細胞によって誘導される毒性の炎症が組織に拡大することを許容する。  
30

## 【0074】

実施例2 ALS患者は、健全な対照と比較してPBMC中の上昇したレベルのLIN<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>細胞を示す  
40

骨髓細胞集団は多くの異なる細胞型を含み、骨髓細胞分化はプロセスの連続であるため、MDSCは未成熟から成熟までの骨髓細胞のスペクトルを反映する多様な表現型マーカーを示し得る。

## 【0075】

この研究において、本発明者らは、ALS患者の血液中のLin<sup>-</sup> / DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>細胞のレベル、すなわちALS患者の血液中の実施例1に示したものとは異なるMDSCの表現型、が同様に上昇することを示す。詳細には、ALS患者および健全な対照（各々、n=15および10）の全血試料をLin、HLA-DRおよびCD33に対するモノクローナル抗体で染色し；各患者について総単球集団の中からのLin<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>細胞のパーセントをFACSによって測定した。図  
50

2に示すように、ALS患者における総単球の中からのLin<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / CD33<sup>+</sup>骨髄細胞のパーセントは、健全な対照と比較して顕著に高かった。

#### 【0076】

転移性腎臓細胞癌を有する患者の末梢血液から単離したCD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> MDSCの頻度は、健全なドナーからのCD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>細胞と比較して顕著に上昇していることが見出された。さらに見出されるように、健全なドナーではなく腎臓細胞癌患者の末梢血液から単離したMDSCは、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)との相互作用の際に反応性酸素種および一酸化窒素の分泌を介して抗原-特異的T-細胞応答をイン・ビトロ(in vitro)で抑制することができた(Kusmartsevら, 2008)。

#### 【0077】

実施例3. ALS患者は上昇したレベルの - T-細胞を示す

ガンマ-デルタ( )T細胞は、その表面に異なるT細胞受容体(TCR)を有する小さいサブセットのT細胞を表す。この細胞は微生物および腫瘍に対する宿主防御に関与するが、その機能の様式はほとんど解明されていないままである。

#### 【0078】

種々の、時々衝突するエフェクターの機能は、その組織分布、抗原-受容体構造および局所的な微小環境に依存してこれらの細胞に起因している。詳細には、免疫監視および免疫調整において役割を演じることが示されており(Girardi, 2006)、IL-17の重要な起源であること(Roarkら, 2008)および強固なCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T-細胞応答を誘導すること(Brandesら, 2009)が見出された。

#### 【0079】

この研究においては、ALS患者のPBMC中の T細胞のレベルを健全な対照のPBMC中のものと比較した。詳細には、ALS患者および健全な対照(各グループn=7)の新たに単離したPBMCをCD3に対するモノクローナル抗体および T細胞受容体に対するモノクローナル抗体で二重染色し、総CD3細胞からの T細胞のパーセントをFACSによって測定した。図3に示すように、ALS患者における総CD3+細胞からの T-細胞のパーセントは健全な対照のものよりも顕著に高く、このことは、このユニークな細胞サブセットがALSについての生物学的マーカーとしても用い得ることを示していた。

#### 【0080】

参考文献

[著者掲載なし] Anti-inflammatory drugs fall short in Alzheimer's disease, Nat Med., 2008, 14(9), 916

Beers D.R., Henkel J.S., Xiao Q., Zhao W., Wang J., Yen A.A., Siklos L., Mcckercher S.R., Appel S.H., Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis, Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103, 16021-16026

Beers D.R., Henkel J.S., Zhao W., Wang J., Appel S.H., CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS, Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(40), 15558-15563

Boillee S., Yamanaka K., Lobsiger C.S., Copeland N.G., Jenkins N.A., Kassiotis G., Kollias G., Cleveland D.W., Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia, Science, 2006, 312, 1389-1392

Brandes M., Willimann K., Bioley G., Levy N., Eberl M., Luo M., Tampe R., Levy F., Romero P., Moser B., Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses, Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(7), 2307-2312

Bunt S.K., Sinha P., Clements V.K., Leips J., Ostrand-Rosenberg S., Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression, J Immunol., 2006, 176(1), 284-290

10

20

30

40

50

Butovsky O. , Hamaoui M.K. , Kunis G. , Ophir E. , Landa G. , Cohen H. , Schwartz M. , Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1 , Proc Natl Acad Sci USA , 2006 , 103(31) , 11784-11789

Cardona A.E. , Pioro E.P. , Sasse M.E. , Kostenko V. , Cardona S.M. , Dijkstra I.M. , Huang D. , Kidd G. , Dombrowski S. , Dutta R. , Lee J.C. , Cook D.N. , Jung S. , Lira S.A. , Littman D.R. , Ransohoff R.M. , Nat Neurosci. , 2006 , 9(7) , 917-924

Chiu I.M. , Chen A. , Zheng Y. , Kosaras B. , Tsiftsoglou S.A. , Vartanian T.K. , Brown R.H. Jr , Carroll M.C. , T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS , Proc Natl Acad Sci USA , 2008 , 105(46) , 1791-1798

Clement A.M. , Nguyen M.D. , Roberts E.A. , Garcia M.L. , Boillee S. , Rule M. , McMahon A.P. , Doucette W. , Siwek D. , Ferrante R.J. , Brown R.H. , Julien Jr. J-P. , Goldstein L.S.B. , Cleveland D.W. , Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice , Science , 2003 , 302 , 113-117

Corti S. , Locatelli F. , Donadoni C. , Guglieri M. , Papadimitriou D. , Strazzer S. , Del Bo R. , Comi G.P. , Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS , heart and skeletal muscle tissues , Brain , 2004 , 127(11) , 2518-2532

10

20

Dunn G.P. , Bruce A.T. , Ikeda H. , Old L.J. , Schreiber R.D. , Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape , Nat Immunol , 2002 , 3(11) , 991-998

Etminan M. , Carleton B.C. , Samii A. , Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of Parkinson disease: a retrospective cohort study , J Clin Neurosci , 2008 , 15(5) , 576-577

Frey A.B. , Myeloid suppressor cells regulate the adaptive immune response to cancer , J Clin Invest. , 2006 , 116(10) , 2587-2590

Frey A.B. , Monu N. , Signaling defects in anti-tumor T cells , Immunol Rev. , 2008 , 222 , 192-205

Gendelman H.E. , J Neurovirol. , 2002 , 8(6) , 474-479

Girardi M. , Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells , J Invest Dermatol. , 2006 , 126(1) , 25-31

30

Gordon P.H. , Moore D.H. , Miller R.G. , Florence J.M. , Verheijde J.L. , Doorish C. , Hilton J.F. , Spitalny G.M. , MacArthur R.B. , Mitsumoto H. , Neville H.E. , Boylan K. , Mozaffar T. , Belsh J.M. , Ravits J. , Bedlack R.S. , Graves M.C. , McCluskey L.F. , Barohn R.J. , Tandan R. , Western ALS Study Group. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial , Lancet Neurol. , 2007 , 6(12) , 1045-1053

Gowing G. , Philips T. , Van Wijmeersch B. , Audet J.N. , Dewil M. , Van Den Bosch L. , Billiau A.D. , Robberecht W. , Julien J.P. , Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase , J Neurosci , 2008 , 28 , 10234-10244

40

Graves M.C. , Fiala M. , Dinglasan L.A. , Liu N.Q. , Sayre J. , Chiappelli F. , van Kooten C. , Vinters H.V. , Inflammation in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord and brain is mediated by activated macrophages , mast cells and T cells , Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. , 2004 , 5(4) , 213-219

Hauben E. , Nevo U. , Yoles E. , Moalem G. , Agranov E. , Mor F. , Akselrod S. , Neeman M. , Cohen I.R. , Schwartz M. , Lancet , 2000 , 355(9200) , 286-287

Hauben E. , Gothilf A. , Cohen A. , Butovsky O. , Nevo U. , Smirnov I. , Yoles E. , Akselrod S. , Schwartz M. , J Neurosci. , 2003 , 23(25) , 8808-8819

50

Huang H., [Effect of transplantation of wild-type bone marrow stem cells in mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis], Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yu an Xue Bao , 2006 , 28 (4) , 562-566]

Henkel J.S. , Beers D.R. , Siklos L. , Appel S.H. , The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS , Mol Cell Neurosci , 2006 , 31(3) , 427-437

Karman J. , Ling C. , Sandor M. , Fabry Z. , Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells , J Immunol , 2004 , 173(4) , 2353-2361

Kipnis J. , Yoles E. , Schori H. , Hauben E. , Shaked I. , Schwartz M. , J Neurosci . , 2001 , 21(13) , 4564-4571

Kipnis J. , Mizrahi T. , Hauben E. , Shaked I. , Shevach E. , Schwartz M. , Proc Natl Acad Sci USA , 2002 , 99(24) , 15620-15625

Kusmartsev S. , Su Z. , Heiser A. , Dannull J. , Eruslanov E. , Kubler H. , Yancey D . , Dahm P. , Vieweg J. , Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma , Clin Cancer Res. , 2008 , 14(24) , 8270-8278

Laurie C. , Reynolds A. , Coskun O. , Bowman E. , Gendelman H.E. , Mosley R.L. , CD4+ T cells from Copolymer-1 immunized mice protect dopaminergic neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease , J Neuroimmunol , 2007 , 183(1) , 60-68

Ling C. , Sandor M. , Suresh M. , Fabry Z. , Traumatic injury and the presence of antigen differentially contribute to T-cell recruitment in the CNS , J Neurosci , 2006 , 26(3) , 731-741

Makarenkova V.P. , Bansal V. , Matta B.M. , Perez L.A. , Ochoa J.B. , CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress , J Immunol. , 2006 , 176(4) , 2085-2094

Marchetti B. , Serra P.A. , Tirolo C. , L'episcopo F. , Caniglia S. , Gennuso F. , Testa N. , Miele E. , Desole S. , Barden N. , Morale M.C. , Brain Res Rev. , 2005 , 48(2) , 302-321

Moalem G. , Leibowitz-Amit R. , Yoles E. , Mor F. , Cohen I.R. , Schwartz M. , Nat Med ed. , 1999 , 5(1) , 49-55

Moisse K. , Strong M.J. , Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis , Biochim Biophys Acta. , 2006 , 1762(11-12) , 1083-1093

Nagaraj S. , Gabrilovich D.I. , Myeloid-derived suppressor cells , Adv Exp Med Biol. , 2007 , 601 , 213-223

Nagaraj S. , Gabrilovich D.I. , Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells , Cancer Res. , 2008 , 68(8) , 2561-2563

Nevo U. , Kipnis J. , Golding I. , Shaked I. , Neumann A. , Akselrod S. , Schwartz M . , Trends Mol Med. , 2003 , 9(3) , 88-93

Ochoa A.C. , Zea A.H. , Hernandez C. , Rodriguez P.C. , Arginase , prostaglandins , and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma , Clin Cancer Res. , 2007 , 13(2 Pt 2) , 721s-726s

Rapalino O. , Lazarov-Spiegler O. , Agranov E. , Velan G.J. , Yoles E. , Fraidakis M. , Solomon A. , Gepstein R. , Katz A. , Belkin M. , Hadani M. , Schwartz M. , Nat Med . , 1998 , 4(7) , 814-821

Roark C.L. , Simonian P.L. , Fontenot A.P. , Born W.K. , O'Brien R.L. , Gammadelta T cells: an important source of IL-17 , Curr Opin Immunol. , 2008 , 20(3) , 353-357

Rolls A. , Avidan H. , Cahalon L. , Schori H. , Bakalash S. , Litvak V. , Lev S. , Lider O. , Schwartz M. , A disaccharide derived from chondroitin sulphate proteoglycan promotes central nervous system repair in rats and mice , Eur J Neurosci , 2004

10

20

30

40

50

- , 20(8) , 1973-1983
- Rosen D.R. , Mutations in Cu / Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis , Nature , 1993 , 364 , 362
- Sargsyan S.A. , Monk P.N. , Shaw P.J. , Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis , Glia. , 2005 , 51(4) , 241-253
- Schori H. , Yoles E. , Schwartz M. , T-cell-based immunity counteracts the potent ial toxicity of glutamate in the central nervous system , J. Neuroimmunol. , 2001 , 119(2) , 199-204
- Schwartz M. , Autoimmunity as the body's defense mechanism against the enemy within: Development of therapeutic vaccines for neurodegenerative disorders , J Neu rovirol. , 2002 , 8(6) , 480-485 10
- Schwartz M. , Hauben E. , Science , 2002 , 296(5572) , 1400
- Schwartz M. , Kipnis J. , Trends Immunol. , 2002 , 23(11) , 530-534 [Erratum in: Trends Immunol. , 2003 , 24(1) , 12]
- Schwartz M. , Shaked I. , Fisher J. , Mizrahi T. , Schori H. , Trends Neurosci. , 20 03 , 26(6) , 297-302
- Seksenyan A. , Ron-Harel N. , Azoulay D. , Cahalon L. , Cardon M. , Rogeri P. , Ko M .K. , Weil M. , Bulvik S. , Rechavi G. , Amariglio N. , Konen E. , Koronyo-Hamaoui M. , Somech R. , Schwartz M. , Thymic involution in amyotrophic lateral sclerosis , J C ell Mol Med. , 2009, 20
- Serafini P. , Borrello I. , Bronte V. , Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment , phenotype , properties , and mechanisms of immune suppression , Semin Cancer Biol. , 2006a , 16(1) , 53-65
- Serafini P. , Meckel K. , Kelso M. , Noonan K. , Califano J. , Koch W. , Dolcetti L. , Bronte V. , Borrello I. , Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous ant itumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function , J Exp Med. , 2006b , 203(12) , 2691-2702
- Shaked I. , Porat Z. , Gersner R. , Kipnis J. , Schwartz M. , J Neuroimmunol. , 2004 , 146(1-2) , 84-93
- Shaked I. , Tchoresh D. , Gersner R. , Meiri G. , Mordechai S. , Xiao X. , Hart R.P. , Schwartz M. , J Neurochem. , 2005 , 92(5) , 997-1009 30
- Shechter R. , London A. , Varol C. , Raposo C. , Cusimano M. , Yovel G. , Rolls A. , Mack M. , Pluchino S. , Martino G. , Jung S. , Schwartz M. , Infiltrating blood-deriv ed macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery fro m spinal cord injury in mice , PLoS Med. , 2009 , 6(7)
- Sica A. , Bronte V. , Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development , J Clin Invest. , 2007 , 117(5) , 1155-1166
- Simard A.R. , Soulet D. , Gowing G. , Julien J.P. , Rivest S. , Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease , Neuron , 2006 , 49(4) , 489-502 40
- Smyth M.J. , Dunn G.P. , Schreiber R.D. , Cancer immuno surveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor i mmunogenicity , Adv Immunol , 2006 , 90 , 1-50
- Suzuki E. , Kapoor V. , Jassar A.S. , Kaiser L.R. , Albelda S.M. , Gemcitabine sele ctively eliminates splenic Gr-1+ / CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-beari ng animals and enhances antitumor immune activity , Clin Cancer Res. , 2005 , 11(18 ) , 6713-6721
- Taams L.S. , Akbar A.N. , Curr Top Microbiol Immunol. , 2005 , 293 , 115-131
- Talmadge J.E. , Pathways mediating the expansion and immunosuppressive activity o f myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy , Clin C 50

cancer Res. , 2007 , 13(18 Pt 1) , 5243-5248

Weydt P. , Yuen E.C. , Ransom B.R. , Moller T. , Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice , Glia , 2004 , 48(2) , 179-182

Yoles E. , Hauben E. , Palgi O. , Agranov E. , Gothilf A. , Cohen A. , Kuchroo V. , Cohen I.R. , Weiner H. , Schwartz M. , J Neurosci. , 2001 , 21(11) , 3740

Zea A.H. , Rodriguez P.C. , Atkins M.B. , Hernandez C. , Signoretti S. , Zabaleta J. , McDermott D. , Quiceno D. , Youmans A. , O'Neill A. , Mier J. , Ochoa A.C. , Argina se-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion , Cancer Res. , 2005 , 65(8) , 3044-3048

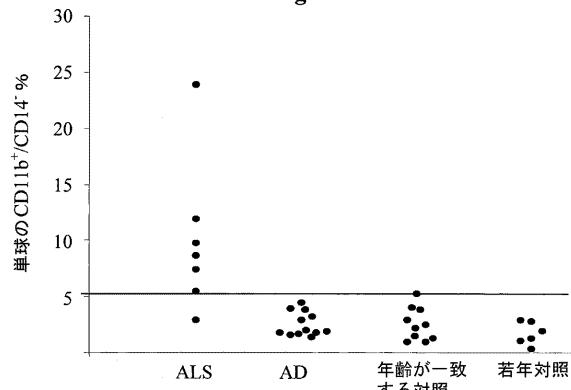
Ziv Y. , Avidan H. , Plichino S. , Martino G. , Schwartz M. , Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury , Proc Natl Acad Sci USA , 2006 , 103(35) , 13174-13179

Ziv Y. , Finkelstein A. , Geffen Y. , Kipnis J. , Smirnov I. , Shpilman S. , Vertkin I. , Kimron M. , Lange A. , Hecht T. , Reyman K.G. , Marder J.B. , Schwartz M. , Yoles E. , A novel immune-based therapy for stroke induces neuroprotection and supports neurogenesis , Stroke , 2007 , 38 (2 Suppl) , 774-782

10

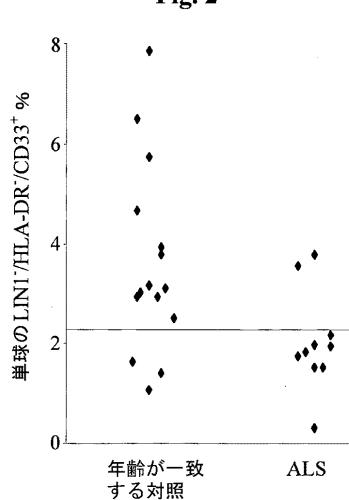
【図1】

Fig. 1



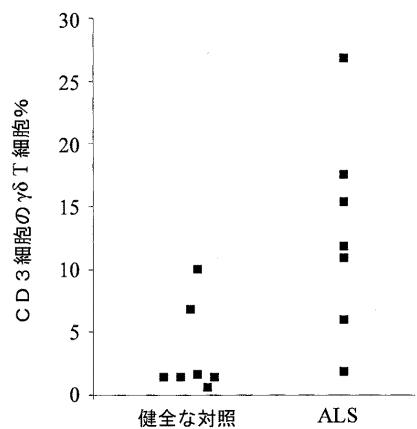
【図2】

Fig. 2



【図3】

Fig. 3



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/4375 (2006.01)	A 6 1 K 31/4375
A 6 1 K 31/4985 (2006.01)	A 6 1 K 31/4985
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02

- (72)発明者 ミカル・アイゼンバッハ - シュヴァルツ  
イスラエル 7 6 1 0 0 レホボト、ハウス 4、アレー・エイチ、ニュー・サイエンティスト・ハウジング、ザ・ワイズマン・インスティチュート・オブ・サイエンス
- (72)発明者 エスター・ヨールズ  
イスラエル 7 6 1 0 0 レホボト、ピーオーボックス 95、ザ・ワイズマン・インスティチュート・オブ・サイエンス内
- (72)発明者 ハダス・ショリ  
イスラエル 7 6 1 0 0 レホボト、ピーオーボックス 95、ザ・ワイズマン・インスティチュート・オブ・サイエンス内

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特表2 0 0 9 - 5 0 7 8 1 8 (JP, A)  
特表2 0 0 7 - 5 2 0 5 5 4 (JP, A)  
特表2 0 0 5 - 5 1 1 0 6 1 (JP, A)  
国際公開第2 0 0 7 / 1 3 6 1 5 7 (WO, A 1)  
MANTOVANI STEFANIA, IMMUNE SYSTEM ALTERATIONS IN SPORADIC AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS PATIENTS SUGGEST AN ONGOING NEUROINFLAMMATORY PROCESS, JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, 2 0 0 9 年 5 月, V210 N1-2, P73-79

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N	3 3 / 4 8
A 6 1 K	3 1 / 4 3 7 5
A 6 1 K	3 1 / 4 9 8 5
A 6 1 K	3 1 / 5 1 9
A 6 1 K	3 1 / 7 0 6 8
A 6 1 K	3 8 / 0 0
A 6 1 K	4 5 / 0 0
A 6 1 K	4 9 / 0 0
A 6 1 P	2 1 / 0 2
G 0 1 N	3 3 / 5 3
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )	
C a p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )	