

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 1 月 9 日(09.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/006952 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/061245
- (22) 国際出願日: 2013 年 4 月 16 日(16.04.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-148787 2012 年 7 月 2 日(02.07.2012) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人理化学研究所(RIKEN)
[JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
Saitama (JP).
- (72) 発明者: 安形 高志(ANGATA Takashi); 〒3510198
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学
研究所内 Saitama (JP). 谷口 直之(TANIGUCHI
Naoyuki); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 石井
健男(ISHII Takeo); 〒1020074 東京都千代田区九段
南 4-7-15 JPR市ヶ谷ビル 8 階 日本
医科大学呼吸ケアクリニック内 Tokyo (JP). 木田
厚瑞(KIDA Kozui); 〒1020074 東京都千代田区九段
南 4-7-15 JPR市ヶ谷ビル 8 階 日本
医科大学呼吸ケアクリニック内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒
1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕

グリーンヒルズMORIタワー 3 2 階 Tokyo
(JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, 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, 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, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING INDICATOR OF EXACERBATION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

(54) 発明の名称: 慢性閉塞性肺疾患の増悪指標の検出方法

(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting an indicator of the exacerbation in a COPD patient, which comprises measuring the expression amount of IL-27 protein or a gene encoding the protein in a biological sample from the COPD patient, then comparing the measured expression amount with the expression amount of the protein or the gene measured in the same type of a biological sample from the COPD patient who is not in an exacerbated disease state, and then detecting the presence of the increase in the expression amount.

(57) 要約: 本発明は、COPD 患者由来の生体試料中の IL-27 タンパク質又はそれをコードする遺伝子の発現量を測定し、該患者の非増悪時のその発現量と比較した増加を検出することを含む、COPD 患者の増悪指標の検出方法に関する。



WO 2014/006952 A1

明 細 書

発明の名称：慢性閉塞性肺疾患の増悪指標の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、慢性閉塞性肺疾患の増悪の診断において利用可能な増悪指標の検出方法に関する。

背景技術

[0002] 慢性閉塞性肺疾患（COPD）とは、タバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じる肺の炎症性疾患である。この疾患の患者は、呼吸機能検査で正常に復すことのない気流閉塞を示す。気流閉塞は末梢気道病変と気腫性病変が様々な割合で複合的に作用することにより起こり、進行性である。COPDは2020年には全世界の死亡原因の第三位を占めると予測されている。COPD患者が同疾患により入院治療を必要とする場合、そのほとんどはCOPDの急性増悪が原因であると考えられている。

[0003] COPDの増悪の指標となる血漿・血清マーカー等の探索が進められている（非特許文献1、2）が、決定的なものは未だ見出されていない。C反応性タンパク質（CRP）がCOPD増悪補助マーカーとしても利用されている（非特許文献2及び3）が、これは、炎症に伴い急激に濃度が上昇する急性期タンパク質であって、増悪そのもののマーカーというよりは増悪の引き金となる感染・炎症のマーカーであり、疾患特異性が低い。ライノウイルス感染をPCRを用いて検出してCOPD患者が増悪を起こしているか否かを調べる技術も報告されている（特許文献1）が、この方法では感染の有無から間接的に増悪を調べることしかできず、またライノウイルスを原因とするごく一部の増悪についてのみ適用できる方法となる。現状では呼吸機能の低下や患者の症状などを指標として個々の医師が総合的に判断をしており、COPDの増悪について客観的で精度の高い指標の開発が望まれている。

[0004] プロラクチンなどを用いたCOPD患者の増悪感受性の検査法が知られている（特許文献2）が、これは増悪自体の指標を提供するものではない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国特許出願第2002/0142294号公報

特許文献2：米国特許出願第2008/0044843号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Barnes P. J., et al., Pulmonary Biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease., (2006) Am. J. Respir. Crit. Care Med., 174:6-14

非特許文献2：Hurst J. R., et al., Use of Plasma Biomarkers at Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease., (2006) Am. J. Respir. Crit. Care Med., 174:867-874

非特許文献3：Muller B. and Tamm M., Biomarkers in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease., (2006) Am. J. Respir. Crit. Care Med., 174:848-849

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、COPD患者の増悪指標の検出方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、IL-27の発現増加がCOPD患者の増悪と関連していることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は以下を包含する。

[1] COPD患者由来の生体試料中のIL-27タンパク質又はそれをコードする遺伝子の発現量を測定し、該患者の非増悪時の発現量と比較した増加を検出することを含む、COPD患者の増悪指標の検出方法。

[2] 生体試料中のIL-27タンパク質の発現量を測定する、上記[1]に記載の方法。

[3] 生体試料が、血液由来試料である、上記[1]又は[2]に記載の方法。

[4] IL-27タンパク質に特異的に結合する抗体を含む、COPD増悪指標の検出用キット。

発明の効果

[0010] 本発明の方法を用いれば、COPD患者の増悪の客観的指標を得ることができる。

本明細書は本願の優先権主張の基礎となる日本国特許出願 特願2012-148787の開示内容を包含する。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0012] シグレック14 (Siglec-14) は自然免疫系の細胞 (顆粒球、単球など) に発現する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク質である (Angata T., et al., Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates., (2006) FASEB J., 20:1964-1973; 特許4423394号明細書)。シグレック14は免疫細胞の活性化に関わること、さらに、ヒトシグレック14遺伝子には多型があり、その遺伝的多型によりシグレック14タンパク質を発現するヒトとしないヒトが存在することが明らかになっている (Yamanaka M., et al., Deletion polymorphism of SIGLEC14 and its functional implications., (2009) Glycobiology. 19:841-846; 特開2010-035551号公報)。本発明者らは、COPDの増悪を惹起することが知られるインフルエンザ菌 (Haemophilus influenza) を用いて免疫細胞を刺激した際、シグレック14タンパク質を発現する免疫細胞がこれを発現しない免疫細胞と比較してより強いサイトカイン応答を示すこと、また、シグレック14遺伝子の遺伝的多型がCOPD患者における増悪感受性に強い影響を及ぼすことを見出している (特願2011-175356)。シグレック14が非莢膜型インフルエンザ菌 (Non-typeable Haemophilus influenzae (NTHi)) を認識して免疫細胞を活性化することから、本発明者らは、シグレック14を発現しておりNTHi刺激で活性

化された免疫細胞において高発現される遺伝子を選抜し、そこからCOPDの増悪マーカーとなる遺伝子／タンパク質を同定することを試みた。その結果、サイトカインの1種であるIL-27タンパク質及びそれをコードする遺伝子がCOPDの増悪マーカーとなることを見出した。本発明はこの知見に基づき、IL-27の発現量の変化を増悪指標として測定することによるCOPD患者の増悪指標の検出（増悪検査）方法を提供する。

[0013] COPD患者では健常人と比べて喀痰中及び血清中のIL-27濃度が高いという報告がある（Cao J., et al., IL-27 is Elevated in Patients with COPD and Patients with Pulmonary TB and Induces Human Bronchial Epithelial Cells to Produce CXCL10., (2012) Chest., 141:121-130）。しかし、COPD患者におけるIL-27濃度の増悪時変化に関する報告はこれまでになく、IL-27がCOPDの増悪マーカーとなることは本発明者らによって初めて見出された。

[0014] 本発明の方法では、COPD患者由来の生体試料中のIL-27タンパク質又はそれをコードする遺伝子の発現量を測定すればよい。

[0015] 医師により慢性閉塞性肺疾患（COPD）と診断される患者（COPD患者）が本発明の方法における好適な検査対象である。現在又は過去に喫煙歴があり、咳嗽や喀痰、呼吸困難がある患者はCOPDである可能性が高い。そのような患者について、肺機能検査を、肺機能検査システムCHESTAC（Chest株式会社）等を用いて行い、常法に従って気管支拡張薬投与後の1秒率（FEV1/FVC）が0.7（70%）以下の患者を、慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者と診断することができる。ここで、FEV1は、一秒量、すなわち、息をできるだけ速く吐き出したときに1秒間で吐き出すことのできる呼気量である。またFVCは、努力肺活量、すなわち、息を大きく吸い込みできるだけ速く吐き出したときの肺活量である。COPD患者は、哺乳動物、好ましくはヒトである。

[0016] 本発明の方法において測定に供する生体試料は、増悪検査を行うCOPD患者から採取する。生体試料は、以下に限定されるものではないが、例えば、血液（例えば、末梢血）、血清、血漿等の血液由来試料、口腔若しくは鼻咽頭粘膜、鼻腔若しくは気管支吸引液、唾液、呼気試料、喀痰等が好ましく、血

液由来試料がより好ましい。

[0017] 本発明の方法は、限定するものではないが、安定期であるが経過観察が望まれるCOPD患者、増悪の疑いがあるCOPD患者、又は症状から増悪と診断されたCOPD患者に由来する生体試料を検査対象として行うことも好ましい。本発明の方法は、例えば、増悪開始から1週間以上が経過したCOPD患者に由来する生体試料を検査対象として好適に行うことができる。増悪開始から1週間以降のCOPD患者由来の生体試料を検査する場合、増悪時にIL-27の発現量が増加している可能性がさらに高いことから、より信頼性の高い指標を得ることができる。増悪そのものではなく細菌感染等を反映すると考えられ、その発現量が増悪開始から1週間以内に低下するC反応性タンパク質（CRP）の場合とは異なり、IL-27の発現量は増悪開始から1週間以降であっても増悪が存在する限り増加した状態を維持する。従って、IL-27は増悪の存在を反映するマーカーとして有用である。なお「増悪開始」は通常は医師の判断により、増悪症状が出現した最初の日付として決定される。

[0018] 本発明では、一人の患者について増悪検査時に採取される生体試料に加えて非増悪時の生体試料についても測定値を得る必要がある。ここで慢性閉塞性肺疾患（COPD）の増悪とは、呼吸困難、咳、喀痰等のCOPDの症状が日常の生理的変動を超えて急激に悪化し、非増悪時（安定期）の治療内容の変更を要する状態をいう（日本呼吸器学会ガイドライン、2009）。COPDの増悪は、Anthonisenらの定義（Anthonisen NR et al., Ann Intern Med. 1987, 106:196-204）や、Rodriguez-Roisinの定義（Rodriguez-Roisin, R. Chest 2000, 117:398S-401S）に従って判別することができる。本発明において、COPD患者の「非増悪時」とは、COPD患者における呼吸困難、咳、喀痰等のCOPDの症状が日常の生理的変動の範囲内に収まっている時期をいう。本発明の方法で検査を行う可能性のあるCOPD患者については、予め非増悪時の生体試料を採取しておくことが好ましい。例えば、非増悪時の生体試料を予め採取して将来の測定用に保存しておき、検査時に採取した生体試料と非増悪時の生体試料を同時期に測定することが好ましい。あるいは非増悪時の生体試料について

予め測定を行っておき、その測定値を検査時の生体試料の測定値と比較してもよい。

[0019] 本発明の方法の一実施形態では、COPD患者の検査時の生体試料及び非増悪時の生体試料中のIL-27タンパク質の発現量を測定することができる。

[0020] なお、上記基準に従って臨床的に非増悪時と判断されたCOPD患者から採取された生体試料であっても、IL-27の発現量が増加している場合は、非増悪時の生体試料から除外することが好ましい。このような場合は、症状が示されていない初期の増悪、終息していない既存の増悪などを表している可能性がある。

[0021] IL-27タンパク質は、IL-27 β サブユニット（EBI3としても知られる）とIL-27 α サブユニット（p28又はIL-30としても知られる）が非共有結合したヘテロダイマータンパク質である。ヒトIL-27 β サブユニットの遺伝子及びアミノ酸配列の配列は公知であり（GenBankアクセッション番号NM_005755.2）、それぞれ配列番号1（mRNAに対応するcDNA配列）及び配列番号2に示す。ヒトIL-27 α サブユニットの遺伝子及びアミノ酸配列の配列は公知であり（GenBankアクセッション番号NM_145659.3）、それぞれ配列番号3（mRNAに対応するcDNA配列）及び配列番号4に示す。

[0022] 本発明の方法の測定対象となるヒトIL-27タンパク質を構成するサイトカインであるIL-27 β サブユニットは、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるものであってよいが、配列番号2に示されるアミノ酸配列において1～100個（例えば、1～50個又は1～10個）のアミノ酸残基の欠失、置換又は付加を含む配列からなり、サイトカイン活性を有するタンパク質、例えば配列番号2に示されるアミノ酸配列からシグナルペプチド（配列番号2のN末端の1～20残基）が除去された配列からなるタンパク質等であってもよい。本発明の方法において測定対象となるヒトIL-27タンパク質を構成するサイトカインであるIL-27 α サブユニットは、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるものであってよいし、配列番号4に示されるアミノ酸配列において1～100個（例えば、1～50個又は1～10個）のアミノ酸残基の欠失、置換又は付加を含む

配列からなり、サイトカイン活性を有するタンパク質、例えば配列番号4に示されるアミノ酸配列からシグナルペプチド（配列番号4のN末端の1～28残基）が除去された配列からなるタンパク質等であってもよい。

[0023] IL-27タンパク質の発現量の測定は、生体試料中のIL-27タンパク質を、ELISA法やフローサイトメトリー等に基づく公知のタンパク質測定法を用いて定量することにより実施することができる。例えば、生体試料中のIL-27タンパク質を、IL-27タンパク質、IL-27 β サブユニット、又はIL-27 α サブユニットに特異的に結合する抗体を用いて、ELISA法に基づきIL-27タンパク質を測定することができる。本発明における測定に用いる、IL-27タンパク質、IL-27 β サブユニット、又はIL-27 α サブユニットに特異的に結合する抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であってよい。測定には市販の様々な抗IL-27抗体やヒト又はマウスIL-27 ELISAアッセイキットを利用することもできる。例えば、R&D Systems社からは、IL-27 α サブユニットとIL-27 β サブユニットをリンカーペプチドでつないだ組換え融合タンパク質を抗原として用いて作製したポリクローナル抗体や、それを用いるIL-27検出用のELISAキットを購入することができる。IL-27タンパク質、IL-27 β サブユニット、又はIL-27 α サブユニットに特異的に結合する抗体は、IL-27タンパク質、IL-27 β サブユニット若しくはIL-27 α サブユニット又はそれらの断片を抗原として用いて公知の免疫学的手法又は遺伝子工学的手法により作製することもできる。例えば、IL-27タンパク質、IL-27 β サブユニット、又はIL-27 α サブユニットに対するポリクローナル抗体は、それらを抗原として用いてマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ロバ等の動物を免疫感作し、一定期間経過後血清を採取し、プロテインA、プロテインG、抗原タンパク質、抗原ペプチドなどを固相化したカラム等で精製することにより取得することができる。またIL-27タンパク質、IL-27 β サブユニット、又はIL-27 α サブユニットに対するモノクローナル抗体は、上記ポリクローナル抗体と同様の免疫感作を行い、一定期間経過後、例えば脾臓細胞を採取し、該細胞とミエローマ細胞とを細胞融合し、得られたハイブリドーマをスクリーニングし、用いた抗原タ

ンパク質に対して特異的な結合性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選抜して、その培養物又は培養上清から調製することができる。また、それらの抗体の抗原結合性フラグメント（Fab、F(ab')₂等）も、全抗体と同様に測定に使用することができる。生体試料中のIL-27タンパク質の定量は、サイトカインアッセイキットを用いたマルチプレックスビーズアレイ法（Procarta Cytokine Assay Kit, Affymetrix）によって行うこともできる。

[0024] このようにして得られた生体試料中のIL-27タンパク質の測定値を、IL-27タンパク質の発現量とすることができる。IL-27タンパク質の発現量は、濃度等の計測値で表してもよいし、相対値として表してもよい。

[0025] 以上のようにして得られたCOPD患者の検査時の生体試料のIL-27タンパク質の発現量を、同じ患者の非増悪時の生体試料について同様にして測定されたIL-27タンパク質の発現量と比較する。

[0026] 本発明の方法の別の一実施形態では、COPD患者の増悪検査時の生体試料及び非増悪時の生体試料中の、IL-27タンパク質をコードする遺伝子の発現量を測定してもよい。ここで「IL-27タンパク質をコードする遺伝子」は、IL-27タンパク質を構成するIL-27 β サブユニット又はIL-27 α サブユニットをコードする遺伝子を意味する。測定対象のIL-27 β サブユニットをコードする遺伝子は、配列番号1に示される塩基配列からなるものであってもよいし、配列番号1に示される塩基配列において1～10個（例えば、1～5個）の塩基の欠失、置換又は付加を含む配列からなり、サイトカイン活性を有するタンパク質をコードするものであってもよい。IL-27 α サブユニットをコードする遺伝子は、配列番号3に示される塩基配列からなる核酸であってもよいし、配列番号3に示される塩基配列において1～10個（例えば、1～5個）の塩基の欠失、置換又は付加を含む配列からなり、サイトカイン活性を有するタンパク質をコードする核酸であってもよい。IL-27 α サブユニットをコードする遺伝子はまた、配列番号3に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつサイトカイン活性を有するタンパク質をコードする核酸であってもよいし、配列番号3に示される塩基配列に対して70%以上、好

ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつサイトカイン活性を有するタンパク質をコードする核酸であってもよい。本発明において「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成される条件をいい、例えば、相同性が高い核酸同士、すなわち90%以上、好ましくは95%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム塩濃度が15~750mM、好ましくは50~750mM、より好ましくは300~750mM、温度が25~70℃、好ましくは50℃~70℃、より好ましくは55~65℃、ホルムアミド濃度0~50%、好ましくは20~50%、より好ましくは35~45%での条件をいう。さらに、ストリンジントな条件では、ハイブリダイゼーション後のフィルターの洗浄条件が、通常はナトリウム塩濃度が15~600mM、好ましくは50~600mM、より好ましくは300~600mM、温度が50~70℃、好ましくは55~70℃、より好ましくは60~65℃である。上記「核酸」は、DNA又はRNAであってよく、修飾塩基を一部に含んでいてもよい。

[0027] IL-27タンパク質をコードする遺伝子の発現量の測定は、生体試料から抽出される核酸試料、好ましくはトータルRNAについて、当該遺伝子から発現されたmRNAの量を測定することにより行うことができる。トータルRNAの抽出は、市販のRNA抽出キット等を用いて常法により行うことができる。IL-27 β サブユニット又はIL-27 α サブユニットをコードする遺伝子由来のmRNA量の測定は、IL-27 β サブユニット又はIL-27 α サブユニットをコードする遺伝子から転写されたmRNAを特異的に増幅可能なPCRプライマー対を用いて定量的PCRにより実施することができる。あるいはそのようなmRNA量の測定は、IL-27 β サブユニット又はIL-27 α サブユニットをコードする遺伝子に特異的なプローブを用いて、ノーザンブロット法に基づいて行うことができる。当業者であれば、IL-27 β サブユニット又はIL-27 α サブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、例えば配列番号1又は3に示される塩基配列に基づいて、適切なプライマー又はプローブを適切に設計することができる。

- [0028] 以上のようにして測定された、生体試料中のIL-27 β サブユニット又はIL-27 α サブユニットをコードする遺伝子から発現されたmRNA量を、IL-27タンパク質をコードする遺伝子の発現量とすることができる。その発現量は、濃度等の計測値で表してもよいし、相対値として表してもよい。
- [0029] 次いで、COPD患者の増悪検査時の生体試料のIL-27タンパク質をコードする遺伝子の発現量を、同じ患者の非増悪時の生体試料中のIL-27タンパク質をコードする遺伝子の発現量と比較する。
- [0030] 本発明の方法では、COPD患者の増悪検査時の生体試料中のIL-27タンパク質又はIL-27タンパク質をコードする遺伝子の発現量を、同じ患者の非増悪時の生体試料中の対応する発現量と比較し、増悪検査時の生体試料での発現量が非増悪時の生体試料での発現量よりも増加したかどうかを判定する。その結果、検査時の生体試料での発現量が非増悪時の生体試料での発現量よりも増加した場合、当該COPD患者においてCOPDの増悪が生じている可能性が高いことが示される。さらに、検査時の生体試料での発現量が非増悪時の生体試料での発現量と比べて5%以上、好ましくは10%以上、さらに好ましくは20%以上増加した場合には、COPDの増悪が生じている可能性が特に高いということができる。
- [0031] 以上のようにして、COPD患者由来の生体試料中のIL-27タンパク質又はそれをコードする遺伝子の発現量を測定し、該患者の非増悪期の発現量と比較した増加を検出することにより、その検出結果を、COPD患者の増悪の可能性を示す客観的指標とすることができる。本発明は、このようなCOPD患者の増悪指標の検出方法を提供する。
- [0032] 本発明の方法によれば、例えば、症状からCOPDであると確定判断できない患者において、増悪を示す客観的指標を検出することができ、COPDの診断を裏付けることができる。さらに、本発明の方法を用いれば、治療中のCOPD患者について、増悪抑制／改善治療の有効性を判断するのに利用可能な指標として、本発明に係る増悪指標を得ることができる。本発明の方法では、特に、増悪開始日から1週間以降のCOPD患者について検査する場合に、IL-27の増

加は、増悪についてより信頼性の高い指標となりうる。したがって、治療の有効性の判断などの目的でCOPDの増悪の経過を長期にわたり（好ましくは1週間以上）モニタリングする場合、本発明の方法は特に有利である。

- [0033] 本発明はまた、IL-27タンパク質に特異的に結合する抗体を含む、COPD増悪指標の検出用キットも提供する。IL-27タンパク質に特異的に結合する抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよく、上述のIL-27タンパク質測定用のものと同様である。当該キットは、IL-27タンパク質に特異的に結合する抗体に加えて、他の試薬、例えば抗体検出用の二次抗体等のELISAアッセイ用試薬や、バッファー、固相（例えば、ビーズ）、COPD増悪指標検出用の使用説明書等をさらに含んでもよい。

実施例

- [0034] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

- [0035] [実施例1] 増悪の血清マーカー候補の選定

(1) NTHi死菌の調製、THP-1細胞の刺激とRNAの調製

非莢膜型インフルエンザ菌（Non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi)）2019株を、文献の記載に従って0.5 mMのN-アセチルノイラミン酸を添加した最少培地を用いて培養し（Greiner LL et al., *Infect Immun.* 2004, 72:4249-60; Taylor RE, et al., *J Exp Med.* 2010, 207:1637-46）、次いで60℃、30分間の加熱により殺菌した。

- [0036] ヒト単球細胞株であるヒト単球性白血病細胞THP-1にシグレック14遺伝子（配列番号5）のcDNAを安定的に導入した株とシグレック5遺伝子（配列番号6）のcDNAを安定的に導入した株をそれぞれ作製した（Yamanaka M., et al., (2009) *Glycobiology.* 19:841-846）。シグレック14遺伝子が導入されそれを発現する細胞は、シグレック14野生型アリルについてホモ接合のヒト単球のモデルである。シグレック5遺伝子が導入されそれを発現する細胞は、シグレック14ヌル型アリルについてホモ接合のヒト単球のモデルである。

[0037] これらの株の細胞をマクロファージ・単球用無血清培地Macrophage-SFM (Invitrogen) に 1×10^6 細胞/ml で懸濁し、6ウェルプレートの各ウェルに2.5 ml ずつ分注した (2.5×10^5 細胞/ウェル)。これらの細胞に、上記で加熱殺菌したNTHi培養物を添加し (2.5×10^8 NTHi/ウェル；コントロールはNTHiを添加せず調製)、炭酸ガスインキュベーター (37°C、5% CO₂) 中で6時間培養した。培養後に遠心操作により細胞を回収し、RNeasy Mini (Qiagen) を用いてトータルRNAを抽出した。

[0038] (2) DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

DNAマイクロアレイを用いた各細胞における遺伝子発現解析 (Affymetrix) を、以下の手順で実施した。

[0039] i) RNAの定量と品質の確認

上記(1)で細胞から抽出したトータルRNAを、2100 Bioanalyzer (Agilent) を用いて解析し、RNAの品質 (分解が少ない) を確認した。また分光光度計NanoDropで濃度及び純度を測定した。

[0040] ii) ビオチン標識RNAの調製と断片化

上記のトータルRNA 250 ngをテンプレートに用い、GeneChip (登録商標) 3' IVT Express Kit (Affymetrix) を使用して第一鎖cDNA及び第2鎖cDNAを逐次合成し、更にin vitro転写によりビオチン標識RNAを調製し、プロトコルに従って断片化した。

[0041] iii) DNAマイクロアレイへのハイブリダイゼーション

断片化したビオチン標識RNAをDNAマイクロアレイHuman Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix) にハイブリダイズ (45°C、16時間) させた。ハイブリダイズにはハイブリダイゼーション用オープンGeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix) を用いた。

[0042] iv) ハイブリダイズしたビオチン標識RNAの検出

試薬としてGeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit (Affymetrix) を、装置としてGeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) を用いて、ハイブリダイズした断片化ビオチン標識RNAに蛍光標識ストレプトアビジンを結

合させ、洗浄し、スキャナーGeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) を用いて画像をスキャンした。GeneChip Fluidics Station 450及びGeneChip Scanner 3000 7Gの制御にはソフトウェアGeneChip Operating Software (Affymetrix) を使用した。

[0043] v) 遺伝子発現の定量

GeneChip Operating Softwareを用いて、スキャンした画像から各スポットの蛍光強度を定量し、定量値を標準化した。

[0044] (3) 遺伝子発現パターンに基づくマーカー候補の選定

以上のようにして遺伝子発現を調べた各サンプルは以下のとおりである。

サンプルA: シグレック 1 4 遺伝子導入/THP-1細胞, NTHi (+)

サンプルB: シグレック 1 4 遺伝子導入/THP-1細胞, NTHi (-)

サンプルC: シグレック 5 遺伝子導入/THP-1細胞, NTHi (+)

サンプルD: シグレック 5 遺伝子導入/THP-1細胞, NTHi (-)

ここで、サンプルAとサンプルBの遺伝子発現パターンを比較してAの方がBの約2倍以上の発現を示し、かつ、サンプルAとサンプルCの遺伝子発現パターンを比較してAの方がCの約2倍以上の発現を示す遺伝子を抽出した。更に、遺伝子発現レベルが一定の水準以上であること、遺伝子産物であるタンパク質が分泌されること、タンパク質が肝臓で合成されていないこと、タンパク質の測定法が確立されていること、等の条件をクリアした複数の遺伝子を選択し、「COPD増悪の血清マーカー候補」とした。選択された「COPD増悪の血清マーカー候補」遺伝子群には、ヘテロダイマータンパク質IL-27の β サブユニットをコードする遺伝子EBI3 (IL-27 β とも称される) が含まれていた。

[0045] [実施例2] 患者由来増悪時・非増悪時ペア血清サンプルを用いたマーカー候補の定量解析

(1) 患者のリクルートメントと血清の調製

日本医科大学呼吸ケアクリニックに来院した外来患者のうち、以下の条件を満たす方に研究への参加意思の有無を訊ねた：(a) 現在又は過去に喫煙歴があること、及び(b) 咳嗽、喀痰、及び呼吸困難があること。研究参加の意

志表示をした患者からはインフォームドコンセントを得た。インフォームドコンセントを得た患者から安定時（非増悪時）及び増悪時に採血を行い、常法に従って血清を調製した。肺機能検査を肺機能検査システムCHESTAC（Chest株式会社）を用いて行い、常法に従って気管支拡張薬投与後の1秒率（FEV1/FVC）が0.7（70％）以下の患者を慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者と診断した。

[0046] なお増悪開始後一週間以降に採血された血清試料にはその旨を情報として登録した。増悪の開始日は、患者に出現した症状を基に医師が判断した。

[0047] (2) マーカー候補の定量

実施例1で「COPD増悪の血清マーカー候補」として絞り込んだ遺伝子に関して、マルチプレックスビーズアレイ法（Procarta Cytokine Assay Kit, Human By Request; Panomics/Affymetrix）を用いて、以下の手順でそれぞれの発現産物に対応するタンパク質の測定を行った（ $n = 39$ ）。本法はLuminex社のxMAPテクノロジーの応用により、同一試料中の複数の測定対象を同時に定量する方法である。Panomics/Affymetrix社のプロトコル（Procarta Cytokine Assay Kit, User Manual Specifically for Serum and Plasma Samples; P/N 10483）に従って測定を行った。

[0048] i) 抗体ビーズの用意

フィルタープレートセットしたマルチスクリーンバキュームマニホールド（Millipore）に、キャプチャー抗体を固相化した抗体ビーズ（それぞれ固有の量の蛍光色素でラベルされている）混合物を各ウェル50 μ lずつ添加して吸引して液を除き、Wash Bufferで洗浄し、吸引して液を除いた。

[0049] ii) 解析対象の抗体ビーズへの吸着

各ウェルにAssay Bufferを25 μ lずつ添加し、さらに25 μ lの血清又は定量用標準混合物（Standard Buffer、Human Serum with Human Assay Bufferを用いて4倍希釈系列を作成）を添加し、振盪しながら室温で60分インキュベートした。吸引して液を除き、Wash Bufferで洗浄し、吸引して液を除いた。

[0050] iii) ビオチン化抗体の結合

各ウェルに25 μ lのビオチン標識された検出用抗体の混合物を添加し、振盪しながら室温で30分インキュベートした。吸引して液を除き、Wash Bufferで洗浄し、吸引して液を除いた。

[0051] iv) ストレプトアビジン-蛍光色素コンジュゲートとの結合

各ウェルに50 μ lのストレプトアビジン-R-フィコエリスリン溶液を加え、振盪しながら室温で30分インキュベートした。吸引して液を除き、Wash Bufferで洗浄し、吸引して液を除いた。

[0052] v) 蛍光強度の測定、定量化

各ウェルに120 μ lのReading Bufferを加え、室温で5分振盪し、各ビーズの蛍光測定に供した。蛍光強度の測定にはBio-Plexワークステーション (BI0-RAD) を使用し、データの解析にはBio-Plexマネージャーソフトウェア6.0 (BI0-RAD) を用いて、各試料中の測定対象の濃度を定量した。

[0053] (3) 統計的解析

増悪時と非増悪時のペア血清における各測定対象の測定値を比較した。測定値の分布が正規分布に従わないため、ノンパラメトリックな検定法としてWilcoxonの符号順位検定を採用した。有意水準を0.05とした。

[0054] この結果、IL-27タンパク質の血清中タンパク質濃度が、増悪時に有意に増加することが示された (p値: 0.0472 (< 0.05)、片側検定)。ここで測定した患者集団においては、増悪時のIL-27は、非増悪時と比較して患者毎の値で最大で約148%の増加 (非増悪時: 397.25、増悪時: 988.19) を示した。また非増悪時と比較して増悪時のIL-27測定値が10%以上の増加を示した患者の割合が測定を行ったCOPD増悪患者の45%超に上った。

[0055] 更に、既存のCOPD増悪補助マーカーであるC反応性タンパク質 (CRP) とIL-27を比較した。高感度CRPの測定は株式会社ビー・エム・エルに委託して行った。CRPの定量にはシーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社のN-ラテックス CRP IIを使用した。

[0056] CRPもIL-27も、全数測定 (CRP: 37例、IL-27: 39例) で増悪時に有意に測定値が高かった (片側検定、 $p < 0.05$)。一方、増悪開始後一週間以降に採

血された血清試料に限定して検討したところ、IL-27（25例）は非増悪時と比較して高いが（片側、両側検定とも有意； p 値：0.0027（片側）、0.0053（両側）（ < 0.01 ））、CRP（24例）は高いとはいえない（片側、両側検定とも有意でない； $p > 0.05$ ）ことが示された。

[0057] さらに、膿性痰のある症例（細菌感染症の疑い例、8例）についてその他の症例と比較すると、CRPでは有意に測定値が高かったが、IL-27の測定値は有意に高い結果は示されなかった。このことから、IL-27の増悪時の増加は、細菌感染症罹患時に限定されないことが示された。

[0058] 以上の結果から、IL-27はCOPDの増悪の存在を反映するマーカーであることが示された。このためIL-27は、治療の際の薬効評価などの指標としても有用であると考えられた。

産業上の利用可能性

[0059] 本発明の方法により、COPD患者の増悪の客観的な診断が可能となり、患者のQOL並びに予後の改善、並びに医療資源の有効利用につながることが期待される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] COPD患者由来の生体試料中のIL-27タンパク質又はそれをコードする遺伝子の発現量を測定し、該患者の非増悪時のその発現量と比較した増加を検出することを含む、COPD患者の増悪指標の検出方法。
- [請求項2] 生体試料中のIL-27タンパク質の発現量を測定する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 生体試料が血液由来試料である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] IL-27タンパク質に特異的に結合する抗体を含む、COPD増悪指標の検出用キット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/061245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/68(2006.01) i, C12N15/00(2006.01) i, G01N33/50(2006.01) i

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)

G01N33/68, C12N15/00, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Ju CAO et al., IL-27 is elevated in patients with COPD and patients with pulmonary TB and induces human bronchial epithelial cells to produce CXCL10, Chest, 2012.01, Vol.141, No.1, P.121-130	4/1-3
A	JP 2007-523169 A (Schering Corp.), 16 August 2007 (16.08.2007), paragraph [0058] & US 2005/0214296 A1 & EP 1755641 A & WO 2005/079848 A2 & CA 2555421 A & NO 20064192 A & CN 1921886 A & ZA 200606833 A & BRA PI0507776 & AU 2005215771 A	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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 application or patent 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

12 July, 2013 (12.07.13)

Date of mailing of the international search report

23 July, 2013 (23.07.13)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N33/68(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N33/68, C12N15/00, G01N33/50			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 日本国公開実用新案公報 日本国実用新案登録公報 日本国登録実用新案公報 1 9 2 2－1 9 9 6 年 1 9 7 1－2 0 1 3 年 1 9 9 6－2 0 1 3 年 1 9 9 4－2 0 1 3 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求項の番号
X/A	Ju CAO et al., IL-27 is elevated in patients with COPD and patients with pulmonary TB and induces human bronchial epithelial cells to produce CXCL10, Chest, 2012.01, Vol. 141, No. 1, P. 121-130		4/1-3
A	JP 2007-523169 A（シェーリング コーポレイション）2007.08.16, 【O O 5 8】 & US 2005/0214296 A1 & EP 1755641 A & WO 2005/079848 A2 & CA 2555421 A & NO 20064192 A & CN 1921886 A & ZA 200606833 A & BRA PI0507776 & AU 2005215771 A		1-4
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 1 2 . 0 7 . 2 0 1 3		国際調査報告の発送日 2 3 . 0 7 . 2 0 1 3	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0－8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 海野 佳子 電話番号 0 3－3 5 8 1－1 1 0 1 内線 3 2 5 2	2 J 3 9 0 6