

(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  
2025年3月20日(20.03.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/058005 A1

(51) 国際特許分類:  
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)  
C12Q 1/6869 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/032644

(22) 国際出願日: 2024年9月12日(12.09.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

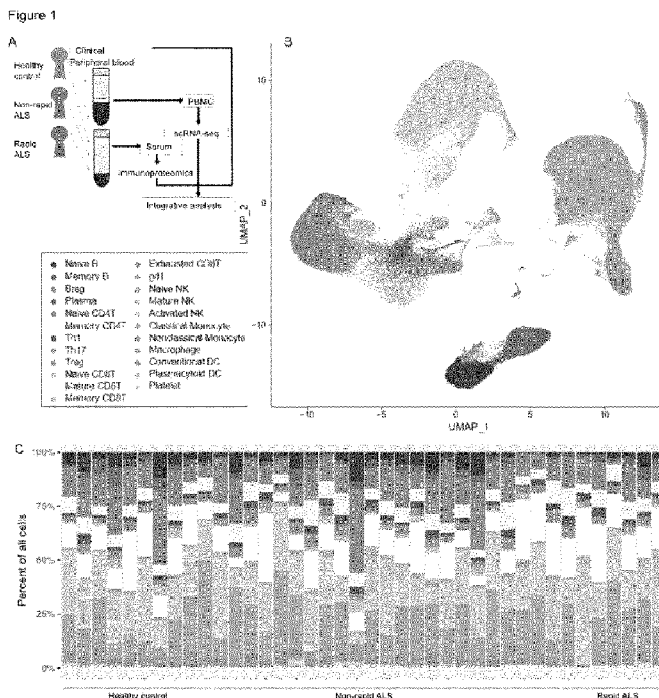
(30) 優先権データ:  
特願 2023-150265 2023年9月15日(15.09.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人徳島大学(TOKUSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 Tokushima (JP).

(72) 発明者: 和泉 唯信(IZUMI, Yuishin); 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内 Tokushima (JP). 藤田 浩司(FUJITA, Koji); 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内 Tokushima (JP). 伊藤 達生(ITUO, Tatsuo); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 原田 夕海(HARADA, Yuumi); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). ヴァルデー, ニヤネスヴァール アクナス(WARUDE, Dnyaneshwar Eknath); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 宮川 秀一(MIYAKAWA, Shuuichi); 〒2510012 神奈川県

(54) Title: BIOMARKER ASSOCIATED WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)

(54) 発明の名称: 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と関連するバイオマーカー



(57) Abstract: Provided is a biomarker for use in the determination or diagnosis of a progression rate of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) or a possibility of being affected by ALS and/or the selection or prediction of a therapeutic drug for ALS. There is discovered a biomarker selected from the group consisting of IL-17A, KLRD1, KRT19, NCF2, TFF2, YTHDF3, Th17, a regulatory T cell (Treg), mature CD8T, naive CD8T, exhausted CD8T, a Classical monocyte, memory CD4T, Th17/Treg, mature CD8T/naive CD8T, and mature CD8T/exhausted CD8T.



WO 2025/058005 A1

藤沢市村岡東二丁目26番地1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 菊川 裕介 (KIKUKAWA, Yusuke); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人:山尾 憲人, 外(YAMAOKA, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号 大阪梅田ツインタワーズ・ノース 青山特許事務所 Osaka (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約: 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の、進行速度または罹患の可能性を決定または診断することにおける、および/または治療薬を選択または予測することにおける、使用のためのバイオマーカーを提供すること。IL-17A、KLRD1、KRT19、NCF2、TFF2、YTHDF3、Th17、制御性T細胞 (Treg)、成熟 (mature) CD8T、ナイーブ (naive) CD8T、疲弊 (exhausted) CD8T、Classical monocyte、メモリー (memory) CD4T、Th17/Treg、mature CD8T/naive CD8T、およびmature CD8T/exhausted CD8Tからなる群から選択される、バイオマーカーを見出した。

## 明 細 書

発明の名称：

筋萎縮性側索硬化症（ALS）と関連するバイオマーカー

### 技術分野

[0001] 本発明は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）と関連するバイオマーカーまたはその使用もしくはその使用方法に関する。

### 背景技術

[0002] 筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、ニューロンに異常が起こり全身の筋肉が萎縮する疾患である（非特許文献1：[https://www.nhk.or.jp/kenko/atc\\_762.html](https://www.nhk.or.jp/kenko/atc_762.html)）。ALSは、運動ニューロン（神経細胞）が障害される神経変性疾患であり、筋萎縮および筋力低下などが進行する疾患である。ALSは、発症後約2～5年で、人工呼吸器装着を必要とするか、または死亡する。さらに、ALSは、日本において、有病率：5～7人／10万人および患者数：約1万人である。さらに、ALSは、孤発性約90%および家族性約10%（SOD1変異など）であることが知られている。

[0003] ALSの症状の評価のために、ALS機能評価スケール改訂版（The revised ALS Functional Rating Scale: ALSFRS-R）を使用することが知られている。ALSFRS-Rは、ALS患者の日常生活を把握するために作成された評価尺度である。ALSFRS-Rは、言語、嚥下、身の回りの動作、歩行などの12項目（0～4の5段階）で構成され、その合計点（0～48）で評価される。ALSFRS-Rは、臨床試験の組み入れ基準、主要評価項目などで使用される。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0004] 非特許文献1：NHK健康チャンネル、「筋肉が衰えるALS（筋萎縮性側索硬化症）の初期症状・合併症」、URL：[https://www.nhk.or.jp/kenko/atc\\_762.html](https://www.nhk.or.jp/kenko/atc_762.html)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] ALSにおいて、末梢血の免疫学的プロファイルは不明な点が多い。特に、症状の進行速度と関連するプロファイルは十分解明されていない。末梢血の免疫学的プロファイルが明らかとなれば、診断、治験等における患者の層別化、治療介入に関するサロゲートマーカー等のため有用と考えられる。よって、ALSの進行速度または罹患の可能性を決定するバイオマーカーの必要性が存在する。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ね、筋萎縮性側索硬化症（ALS）と関連するバイオマーカーまたはその使用（例えば、対象における筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行速度または罹患の可能性を決定または診断するための使用）もしくはその使用方法（例えば、対象における筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行速度または罹患の可能性を決定または診断するための方法）を見出した。

[0007] 本発明者らは、また、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の、進行速度または罹患の可能性を決定または診断することにおける、および／または治療薬を選択または予測することにおける、使用のためのバイオマーカーを見出した。

[0008] 本発明者らは、また、対象における筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行速度または罹患の可能性を決定または診断するための方法であって、前記対象由来のサンプル中のバイオマーカーのレベルを決定することを含む、方法を見出した。

[0009] すなわち、本発明は以下を提供する：

（1）筋萎縮性側索硬化症（ALS）の、進行速度または罹患の可能性を決定または診断することにおける、および／または治療薬を選択または予測することにおける、使用のためのバイオマーカーであって、  
バイオマーカーは、IL-17A、KL RD1、KRT19、NCF2、T

FF2、YTHDF3、Th17、制御性T細胞 (Treg)、成熟 (mature) CD8T、ナイーブ (naive) CD8T、疲弊 (exhausted) CD8T、Classical monocyte、メモリー (memory) CD4T、Th17/Treg、mature CD8T/naive CD8T、およびmature CD8T/exhausted CD8Tからなる群から選択される、バイオマーカー。

(2) 急速の進行速度の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を決定または診断することにおける使用のための、(1) に記載のバイオマーカー。

(3) バイオマーカーが、IL-17AおよびTh17、IL-17Aおよびmemory CD4T、KLRD1およびmature CD8T、TFF2およびmature CD8T、ならびにNCF2およびClassical monocyteからなる組合せから選択される、(1) に記載のバイオマーカー。

(4) 対象における筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の進行速度または罹患の可能性を決定または診断するための方法であって、前記対象由来のサンプル中の(1) から(3) のいずれかに記載のバイオマーカーのレベルを決定することを含む、方法。

(5) 前記バイオマーカーの参照レベルに基づいて、ALSの進行速度または罹患の可能性を決定または診断することをさらに含む、(4) に記載の方法。

(6) 参照レベルが、ALSを有さない対象由来のサンプル、ALSを有する対象由来のサンプル、非急速の進行速度のALSを有する対象由来のサンプル、または急速の進行速度のALSを有する対象由来のサンプル中の前記バイオマーカーのレベルである、(5) に記載の方法。

## 発明の効果

[0010] 本発明によれば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と関連するバイオマーカーまたはその使用もしくはその使用方法が提供される。本発明によれば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の、進行速度または罹患の可能性を決定または

診断することにおける、および／または治療薬を選択または予測することにおける、使用のためのバイオマーカーが提供される。本発明によれば、対象における筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行速度または罹患の可能性を決定または診断するための方法であって、前記対象由来のサンプル中のバイオマーカーのレベルを決定することを含む、方法が提供される。

### 図面の簡単な説明

[0011] [図1] シングルセルRNAシーケンスにおける試験デザインおよび細胞タイプのプロファイリング。A) 末梢血単核球（PBMC）のシングルセルRNAシーケンス（scRNA-seq）解析、血清イムノプロテオミクス、および健常対照者、非急速筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者および急速ALS患者についての臨床情報を統合した本試験の概要。B) 23の同定された細胞タイプを示す、均一マニホールド近似投影（Uniform manifold approximation and projection）（UMAP）。C) 各サンプルについての細胞タイプの頻度。頻度は、各サンプル中の細胞総数を100%としたときの、各細胞タイプの割合として表示されている。DC＝樹状細胞、NK＝ナチュラルキラー。

[図2] 各細胞タイプの頻度のグループ間比較。A) 全細胞における制御性T細胞の頻度。B) 特定の細胞グループにおける細胞タイプの頻度。C) 関連する細胞タイプと比較した細胞タイプの比。それらは、Tukey HSD検定により、非急速ALSと比較して急速の筋萎縮性側索硬化症（ALS）において有意差を示した。数値は各グループについての中央値を示す。線とアスタリスクは、Tukey HSD検定による有意な組み合わせを示す（\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.005$ 、および\*\*\*  $p < 0.0005$ ）。Breg＝制御性B細胞；NK＝ナチュラルキラー；Th1＝ヘルパーT1細胞；Th17＝ヘルパーT17細胞；Treg＝制御性T細胞。

[図3] 血清イムノプロテオミクス。A) 各組み合わせ間の発現差異解析による $-\log_{10} P$ 値および $\log_2$ 倍数変化を示すボルケーノプロット。赤い点は差次発現タンパク質（DEP）であり、タンパク質名を示す。B) 急速の

筋萎縮性側索硬化症（ALS）でDEPとして単離された6つのタンパク質の発現レベルを、非急速のALSと比較して示すバイオリンプロット。数値は各グループの中央値を示す。線とアスタリスクは、Tukey HSD検定による有意な組み合わせを示す（\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.005$ 、および\*\*\*  $p < 0.0005$ ）。C) 酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）により測定されたリン酸化ニューロフィラメントH（pNF-H）の発現レベルを示すバイオリンプロット。IL-17A=インターロイキン-17A；KLD1=キラー細胞レクチン様受容D1；KRT19=ケラチン19；NCF2=好中球細胞質因子2；NPX=正規化タンパク質発現；TF2=トレフォイルファクター2；YTHDF3=YTH N6-メチルアデノシンRNA結合タンパク質F3。

[図4]血清免疫タンパク質と各細胞タイプの頻度/比との相関図。ピアソンの相関係数を用いたシングルセルRNAシーケンス解析における血清タンパク質の発現レベルと各細胞タイプの頻度/比との散布図。数値は、40の筋萎縮性側索硬化症患者と健常対照者サンプルを用いた相関係数を示す。

[図5-1]細胞タイプマーカーによる各クラスターの注釈(Annotation)。

[図5-2]細胞タイプマーカーによる各クラスターの注釈(Annotation) (図5-1の続き)。

[図6]全細胞における各細胞タイプの頻度のグループ間比較。

[図7]各免疫細胞における各細胞タイプの頻度のグループ間比較。

[図8]細胞間の頻度比のグループ間比較。

## 発明を実施するための形態

### [0012] 定義

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載の方法および材料と、類似もしくは同等の任意の方法および材料を、本発明の実施または試験に使用することができる。特に指示しない限り、本発明の実施は、当技術分野の技術の範囲内で、化

学、生化学、分子生物学、細胞生物学、遺伝学、免疫学および薬理学などの従来の方法を採用してよい。

[0013] 本明細書において、「対象」および「患者」は、ヒトまたはあらゆる非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」は、サル等の非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ等の脊椎動物、ならびにマウス、ラット、およびモルモット等のげっ歯類を含むが、これらに限定されない。

[0014] 本明細書において、「筋萎縮性側索硬化症（ALS）」は、運動ニューロン（神経細胞）が障害される神経変性疾患であり、筋萎縮および筋力低下などが進行する疾患を指す。本明細書において、ALSは、「急速の（rapid）進行速度」のALSおよび「非急速の（non-rapid）進行速度」のALSを含む。ALSの「進行速度」は、ALSの「急速の進行速度」およびALSの「非急速の進行速度」を含む。

[0015] 本明細書において、「急速の（rapid）進行速度」のALSは、ALSの症状の評価のためのALS機能評価スケール改訂版（The revised ALS Functional Rating Scale: ALSFRS-R）の点数に基づいて、1月あたり1点以上の低下を示すALSを指す。本明細書において、「急速の（rapid）進行速度」のALS、「急速」のALSおよび「急速」ALSは、互換的に使用される。

[0016] 本明細書において、「非急速の（non-rapid）進行速度」のALSは、ALSの症状の評価のためのALS機能評価スケール改訂版（The revised ALS Functional Rating Scale: ALSFRS-R）の点数に基づいて、1月あたり1点未満の低下を示すALSを指す。本明細書において、「非急速の（non-rapid）進行速度」のALS、「非急速」のALSおよび「非急速」ALSは、互換的に使用される。

[0017] ALS機能評価スケール改訂版を表Aに示す。

[表A-1]

ALSFRS-R (ALS Functional Rating Scale)各項目で該当する数字ひとつに○をつけてください		
1.言語	4	会話は正常
	3	会話障害が認められる
	2	繰り返し聞くと意味がわかる
	1	声以外の伝達手段と会話を併用
	0	実用的会話の喪失
2.唾液分泌	4	正常
	3	口内の唾液はわずかだが、明らかに過剰（夜間はよだれが垂れることがある）
	2	中程度に過剰な唾液（わずかによだれが垂れることがある）
	1	顕著に過剰な唾液（よだれが垂れる）
	0	著しいよだれ（絶えずティッシュペーパーやハンカチを必要とする）
3.嚥下	4	正常な食事習慣
	3	初期の摂食障害（時に食物を喉に詰まらせる）
	2	食物の内容が変化（継続して食べられない）
	1	補助的なチューブ栄養を必要とする
	0	全面的に非経口性または腸管性栄養
4.書字	4	正常
	3	遅い、または書きなぐる（すべての単語が判読可能）
	2	一部の単語が判読不可能
	1	ペンは握れるが、字を書けない
	0	ペンが握れない

[表A-2]

5.摂食動作：胃瘻の設置の有無により，(1)(2)いずれかの一方で評価する	
(1) (胃瘻なし) 食事用具の使い方	
	4 正常
	3 いくぶん遅く，ぎこちないが，他人の助けを必要としない
	2 フォーク・スプーンは使えるが，箸は使えない
	1 食物は誰かに切ってもらわなければならないが，何とかフォークまたはスプーンで食べることができる
	0 誰かに食べさせてもらわなければならない
(2) (胃瘻あり) 指先の動作	
	4 正常
	3 ぎこちないがすべての指先の作業ができる
	2 ボタンやファスナーをとめるのにある程度手助けが必要
	1 介護者にわずかに面倒をかける（身の回りの動作に手助けが必要）
	0 まったく指先の動作ができない
6.着衣，身の回りの動作	4 障害なく正常に着る
	3 努力を要するが（あるいは効率が悪いが）独りで完全にできる
	2 時折，手助けまたは代わりの方法が必要
	1 身の回りの動作に手助けが必要
	0 全面的に他人に依存
7.寝床での動作	4 正常
	3 いくぶん遅く，ぎこちないが，他人の助けを必要としない
	2 独りで寝返ったり，寝具を整えられるが非常に苦勞する
	1 寝返りを始めることはできるが，独りで寝返ったり，寝具を整えることができない
	0 自分ではどうすることもできない

[表A-3]

8.歩行	4	正常
	3	やや歩行が困難
	2	補助歩行
	1	歩行は不可能
	0	脚を動かすことができない
9.階段をのぼる	4	正常
	3	遅い
	2	軽度に不安定, 疲れやすい
	1	介助を要する
	0	のぼれない
呼吸 (呼吸困難, 起坐呼吸, 呼吸不全の3項目を評価)		
10.呼吸困難	4	なし
	3	歩行中に起こる
	2	日常動作 (食事, 入浴, 着替え) のいずれかで起こる
	1	坐位あるいは臥床安静時のいずれかで起こる
	0	極めて困難で補助呼吸装置を考慮する
11.起坐呼吸	4	なし
	3	息切れのため夜間の睡眠がやや困難
	2	眠るのに支えとする枕が必要
	1	坐位でないと眠れない
	0	まったく眠ることができない
12.呼吸不全	4	なし
	3	間欠的に補助呼吸装置 (BiPAPなど) が必要
	2	夜間に継続的に補助呼吸装置 (BiPAPなど) が必要
	1	1日中 (夜間, 昼間とも) 補助呼吸装置 (BiPAPなど) が必要
	0	挿管または気管切開による人工呼吸が必要
合計点数		(48点満点)

[0018] 本明細書において、「罹患の可能性」は、ALSを有している可能性またはALSを発症している可能性を指す。「罹患の可能性」は、高い「罹患の可能性」および低い「罹患の可能性」を含む。高い「罹患の可能性」は、ALSを有していない対象、ALSを発症しない対象または健常者 (healthy control) と比較して、ALSを有している可能性またはALSを発症している可能性が高いことを指す。低い「罹患の可能性」は、ALSを有していない対象、ALSを発症しない対象または健常者と比較して、ALSを有している可能性またはALSを発症している可能性が低いかまたは同程度であることを指す。

- [0019] 本明細書において、「治療薬」は、ALSを処置、予防、または診断するために使用されるあらゆる薬を含む。治療薬は、ALSを処置、予防、または診断するための公知の薬であっても、ALSを処置、予防、または診断するための未知の薬であってもよい。
- [0020] 本明細書において、「バイオマーカー」は、ALSと関連する指標、例えばALSの、進行速度または罹患の可能性を決定または診断することにおける、および／または治療薬を選択または予測することにおける、使用のための指標を指す。本明細書において、バイオマーカーは、測定することができるサンプル中に存在するあらゆる物質、例えば、細胞（例えば免疫細胞、例えばT細胞、B細胞）、ポリペプチド（例えば免疫グロブリン、ペプチド）、ポリヌクレオチド（例えばmRNA、DNA）および／またはそれらの代謝物などを含む。
- [0021] バイオマーカーは、例えば、表2、表4、表5、表6、表7、表8（表8-1、表8-2）、表9（表9-1、表9-2、表9-3、表9-4、表9-5）、図2、図3、図4、図5（図5-1、図5-2）、図6、図7、および図8に記載されている。バイオマーカーは、ALSと関連するバイオマーカー、ALSのバイオマーカー、例えば、急速の進行速度のALSのバイオマーカーおよび／または非急速の進行速度のALSのバイオマーカーを含む。
- [0022] バイオマーカーは、単一の分子であっても、複数の分子であってもよい。バイオマーカーが複数の分子である場合、バイオマーカーは分子間の関係（例えば比率）の表示であってもよい。本明細書において、複数の分子の「単一の分子A／単一の分子B」の記載は、単一の分子Aと単一の分子Bとの比率を示す。例えば、Th17／Tregは、Th17のレベルをTregのレベルで割ることによるTh17とTregとのレベルの比率を表す。
- [0023] バイオマーカーは、1つのバイオマーカーで、または複数（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、または9つ）のバイオマーカーの組合せで、使用されてよい。例えば、複数のバイオマーカーの使用が、単一

のバイオマーカーの使用よりも、より正確な、またはより高精度のALSと関連する指標をもたらすことができる。

- [0024] 本明細書において、バイオマーカーの「レベル」は、バイオマーカーの濃度、発現レベルおよび／または活性レベルなどを指す。当業者は、適宜、バイオマーカーのレベルを決定することができる。
- [0025] 本明細書において、「IL-17A」は、インターロイキン-17A (Interleukin-17A) を指す。
- [0026] 本明細書において、「KLRD1」は、キラー細胞レクチン様受容体D1 (killer cell lectin like receptor D1) を指す。
- [0027] 本明細書において、「KRT19」は、ケラチン19 (keratin 19) を指す。
- [0028] 本明細書において、「NCF2」は、好中球細胞質因子2 (neutrophil cytosolic factor 2) を指す。
- [0029] 本明細書において、「TFF2」は、トレフォイルファクター2 (trefoil factor 2) を指す。
- [0030] 本明細書において、「YTHDF3」は、YTH N6-メチルアデノシンRNA結合タンパク質F3 (YTH N6-methyladenosine RNA binding protein F3) を指す。
- [0031] 本明細書において、「Th17」は、ヘルパーT17細胞を指す。
- [0032] 本明細書において、「Treg」は、制御性T細胞を指す。
- [0033] 本明細書において、「mature CD8T」は、成熟CD8陽性T細胞を指す。
- [0034] 本明細書において、「naive CD8T」は、ナイーブCD8陽性T細胞を指す。
- [0035] 本明細書において、「exhausted CD8T」は、疲弊CD8陽性T細胞を指す。
- [0036] 本明細書において、「Classical monocyte」は、古典的な単球を指す。

- [0037] 本明細書において、「memory CD4 T」は、メモリーCD4陽性T細胞を指す。
- [0038] 本明細書において、「サンプル」は、対象または患者から取得することができる。サンプルは、限定されるものではないが、当技術分野で知られたあらゆる供給源、例えば、血液、全血、血清、血漿、尿、間質液、涙、唾液、または皮膚から得ることができる。
- [0039] 本明細書において、バイオマーカーの「参照レベル」は、ALSを有さない対象由来のサンプル、ALSを有する対象由来のサンプル、非急速の進行速度のALSを有する対象由来のサンプル、または急速の進行速度のALSを有する対象由来のサンプル中のバイオマーカーのレベルを指す。当業者は、適宜、バイオマーカーの参照レベルを選択および決定することができる。
- [0040] 本明細書において、サンプルを取得される対象または患者は、参照レベルを提供するサンプルを取得される対象と同一であっても、異なってもよい。
- [0041] 一態様において、本発明のバイオマーカーは、ALSの進行速度または罹患の可能性を決定または診断するために使用することができる。
- [0042] 一態様において、本発明は、(i) 急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中のバイオマーカーのレベルと、(ii) 非急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカーのレベルと、(iii) ALSを有さない対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカーのレベルとが、変化するという知見に基づくものである。
- [0043] 一態様において、本発明は、(i) 急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中のバイオマーカーのレベルと、(ii) 非急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカーのレベルおよび/または(iii) ALSを有さない対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカーのレベルとが、変化するという知見に基づくものである。
- [0044] 一態様において、本発明は、(ii) 非急速の進行速度のALSを有する

対象から得られたサンプル中のバイオマーカのレベルと、(i) 急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカのレベルおよび／または(iii) ALSを有さない対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカのレベルとが、変化するという知見に基づくものである。

[0045] 一態様において、本発明は、(i) 急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中のバイオマーカのレベルおよび／または(ii) 非急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカのレベルと、(iii) ALSを有さない対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカのレベルとが、変化するという知見に基づくものである。

[0046] 一態様において、本発明は、(i) 急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中のバイオマーカのレベルが、(ii) 非急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカのレベルおよび／または(iii) ALSを有さない対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカのレベルよりも、高いまたは低いバイオマーカを提供する。

[0047] 一態様において、本発明は、(ii) 非急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中のバイオマーカのレベルが、(i) 急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカのレベルおよび／または(iii) ALSを有さない対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカのレベルよりも、高いまたは低いバイオマーカを提供する。

[0048] 一態様において、本発明は、(i) 急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中のバイオマーカのレベルおよび／または(ii) 非急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカのレベルが、(iii) ALSを有さない対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカのレベルよりも、高いまたは低いバイオマーカ

一を提供する。

[0049] 一態様において、本発明のバイオマーカーは、ALSの治療薬を選択または予測するために使用することができる。

[0050] 一態様において、(i) 急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中のバイオマーカーのレベルが、(ii) 非急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカーのレベルおよび／または(iii) ALSを有さない対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカーのレベルよりも、高いまたは低いバイオマーカーのレベルを、それぞれ低下または増加させる治療薬を、可能性のあるまたは有効な急速の進行速度のALSの治療薬として、選択または予測することができる。

[0051] 一態様において、(ii) 非急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中のバイオマーカーのレベルが、(i) 急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカーのレベルおよび／または(iii) ALSを有さない対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカーのレベルよりも、高いまたは低いバイオマーカーのレベルを、それぞれ低下または増加させる治療薬を、可能性のあるまたは有効な非急速の進行速度のALSの治療薬として、選択または予測することができる。

[0052] 一態様において、(i) 急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中のバイオマーカーのレベルおよび／または(ii) 非急速の進行速度のALSを有する対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカーのレベルが、(iii) ALSを有さない対象から得られたサンプル中の同じバイオマーカーのレベルよりも、高いまたは低いバイオマーカーのレベルを、それぞれ低下または増加させる治療薬を、可能性のあるまたは有効な急速および／または非急速の進行速度のALSの治療薬として、選択または予測することができる。

[0053] 一態様において、本発明のバイオマーカーがALSの治療薬を選択または予測するために使用されるとき、候補となるALSの治療薬を本発明のバイ

オマーカーと混合または接触させてよい。候補となるALSの治療薬が、本発明のバイオマーカーのレベルを低下または増加させる薬であってよい。候補となるALSの治療薬が、本発明のバイオマーカーのレベルを低下または増加させることを試験または確認してもよい。

[0054] 一態様において、本発明のバイオマーカーは、ALSの治療薬の効力または性能を決定または予測するために使用することができる。

[0055] 一態様において、本発明のバイオマーカーは、例えば、表2、表4、表5、表6、表7、表8（表8-1、表8-2）、表9（表9-1、表9-2、表9-3、表9-4、表9-5）、図2、図3、図4、図5（図5-1、図5-2）、図6、図7、および図8に記載されている。一態様において、本発明のバイオマーカーは、IL-17A、KLRD1、KRT19、NCF2、TFF2、YTHDF3、Th17、制御性T細胞（Treg）、成熟（mature）CD8T、ナイーブ（naive）CD8T、疲弊（exhausted）CD8T、Classical monocyte、メモリー（memory）CD4T、Th17/Treg、mature CD8T/naive CD8T、およびmature CD8T/exhausted CD8Tからなる群から選択される。一態様において、本発明のバイオマーカーは、NCF2-古典的な単球、TFF2-成熟CD8 T細胞、KLRD1-成熟CD8 T細胞、IL-17A-メモリーCD4 T細胞、およびIL-17A-Th17からなる群から選択される。一態様において、本発明のバイオマーカーは、TFF2-成熟CD8 T細胞、KLRD1-成熟CD8 T細胞、およびIL-17A-Th17からなる群から選択される。一態様において、本発明のバイオマーカーは、例えば実施例に記載されているように、偏相関係数および/またはP値に基づいて選択される。一態様において、本発明のバイオマーカーは、免疫細胞およびタンパク質の組合せであってよい。一態様において、本発明のバイオマーカーは、ALSの進行速度（急速または非急速）または罹患の可能性（高い罹患の可能性または低い罹患の可能性）を決定または診断するために使用することができる。一態様において、本発明のバイオマーカーは、参照レベルよりも増

加または低下していることに基づいて、ALSの進行速度（急速または非急速）または罹患の可能性（高い罹患の可能性または低い罹患の可能性）を決定または診断するために使用することができる。

[0056] 一態様において、本発明のバイオマーカーは、公知のバイオマーカー（例えばニューロフィラメント軽鎖（NfL））と組み合わせて使用されてもよい。

[0057] 一態様において、本発明のバイオマーカーは、早期のALSの進行速度または罹患の可能性の決定または診断を可能にする。ALS患者は、一般的に、12週間の観察期間の後に処置される。しかしながら、本発明のバイオマーカーは、早期の（12週間の観察期間の前に）ALSの進行速度または罹患の可能性の決定または診断を可能にする。早期のALSの進行速度または罹患の可能性の決定または診断は、ALSの早期の処置を可能にし、ALS進行を遅延させるために役立ち得る。

[0058] 一態様において、本発明のバイオマーカーの使用または使用方法において、対象における筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行速度または罹患の可能性を決定または診断するための方法であって、前記対象由来のサンプル中の本発明のバイオマーカーのレベルを決定することを含む。

[0059] 一態様において、本発明のバイオマーカーの使用または使用方法において、バイオマーカーの参照レベルに基づいて、またはバイオマーカーの参照レベルと比較して、ALSの進行速度または罹患の可能性を決定または診断することを含む。

[0060] 一態様において、本発明のバイオマーカーの使用または使用方法において、サンプル中のバイオマーカーのレベルが参照レベルよりも増加または低下していることに基づいて、ALSの進行速度（急速または非急速）または罹患の可能性（高い罹患の可能性または低い罹患の可能性）を決定または診断することを含む。

[0061] 一態様において、本発明は、対象における筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行速度または罹患の可能性を決定または診断するための方法であって、

前記対象由来のサンプル中のバイオマーカのレベルを決定し、  
前記レベルを前記バイオマーカの参照レベルと比較し、  
サンプル中のバイオマーカのレベルが参照レベルよりも増加または低下していることに基づいて、ALSの進行速度（急速または非急速）または罹患の可能性（高い罹患の可能性または低い罹患の可能性）を決定または診断することを含む、方法を提供する。

[0062] 一態様において、本発明のバイオマーカの使用または使用方法において、対象から対象由来のサンプルを取得または提供することを含む。

[0063] 一態様において、本発明のバイオマーカの使用または使用方法において、例えば、ALSを有さない対象由来のサンプル、ALSを有する対象由来のサンプル、非急速の進行速度のALSを有する対象由来のサンプル、または急速の進行速度のALSを有する対象由来のサンプル中のバイオマーカのレベルを決定することによって、参照レベルを決定することを含む。

[0064] 一態様において、本発明のバイオマーカの使用または使用方法において、対象由来のサンプル中のバイオマーカのレベルと異なる時点（例えば1日前、1週前、1月前、1年前など）の前記対象由来のサンプル中の前記バイオマーカのレベルとを比較することを含んでもよい。

[0065] 一態様において、参照レベルは、あらかじめ（以前に）決定されていてもよい。

[0066] 一態様において、本発明は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の、進行速度または罹患の可能性を決定または診断することにおける、および／または治療薬を選択または予測することにおける、使用のための組成物であって、本発明のバイオマーカを含む組成物に関する。

[0067] 一態様において、本発明は、上記態様において選択された、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療薬を患者に投与する事を含む、ALSの治療方法に関する。ALSの治療薬としては、リルゾールやエダラボン等が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態において、治療薬は、本発明のバ

イオマーカに対する抗体、例えばIL-17AまたはIL-17受容体に対する抗体であり得る。

[0068] 特に記載がない限り、本明細書で使用される用語は、当技術分野で通常、使用される用語である。

[0069] 以下に実施例を示して本発明をさらに具体的かつ詳細に説明するが、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されると解すべきではない。

## 実施例

### [0070] 方法

#### 患者と健常対照者

2021年3月29日から2022年10月30日まで、徳島大学病院において、36名の孤発性ALS患者と10名の健常ボランティアをスクリーニングした。ALS患者の組み入れ基準は、updated Awaji基準でdefinite、probable、laboratory-supported probable、またはpossible、またはGold Coast基準でALSと診断され、発症から2年以内の患者とした。患者と健常者の年齢と性別は一致させた。ALS患者と健常者の除外基準を表1に示す。SOD1のようなALSの既知の病因変異を有することが判明した患者は、免疫学的プロファイルが孤発性ALSのそれとは異なるため、あらかじめ解析から除外した。改訂ALS機能評価尺度(ALSFRS-R)の減少が1.0点/月以上( $\Delta$ ALSFRS-R/月 $\geq 1$ )を急速ALSと定義し、ALSFRS-Rの減少が1.0点/月未満( $\Delta$ ALSFRS-R/月 $< 1$ )を非急速ALSと定義した。すべての臨床情報は、患者から書面によるインフォームド・コンセントを得た後に収集された。すべての研究計画は、徳島大学病院生命科学・医学系研究倫理審査委員会第3682号により承認された。調査はヘルシンキ宣言の原則に従って行われた。

#### 表1. 除外基準

## [表1]

- (1) 気管切開を施行している者
- (2) 慢性閉塞性肺疾患（COPD）を有する者
- (3) 同意取得前4週間以内にエダラボンを使用した者
- (4) 同意取得前4週間以内に免疫修飾薬（ステロイド、免疫グロブリン製剤など）を使用した者
- (5) 妊娠中又は妊娠している可能性のある者、授乳中の者
- (6) 重篤な呼吸器疾患、心血管疾患又は肝腎疾患を有する者
- (7) 悪性腫瘍を有する者
- (8) 免疫異常が発症に関与する疾患を有する者（自己免疫疾患など）
- (9) 同意取得前12週以内に治験に参加していた者
- (10) 同意が得られなかった者

## [0071] 検体の調製

徳島大学病院において、健常人ドナーおよびALS患者から末梢血サンプルを採取した。PBMCはFicoll-Hypaque (Lymphoprep™, Serumwerk Bernburg AG, Germany)密度遠心法により調製し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄後、5%FBSを含むX-VIVO™培地（LONZA, Basel, Switzerland）に再懸濁した。PBMCは、CELLBANKER 1（日本全薬工業株式会社、福島、日本）でライブラリーを調製するまで-80℃で保存した。血清サンプルは8.0ml Insepackチューブ（積水、東京、日本）に採取し、3500 rpmで10分間遠心後、分注し、採取後20分以内に-80℃で凍結した。

## [0072] 単一細胞RNA配列決定（scRNA-seq）

ヒトPBMCを解凍、洗浄し、D-PBS/BSAに再懸濁した。濾過後、細胞数と生存率を評価した。scRNA-seqは10x Genomicsを用いて行った。一次解析はCell Rangerを用い、二次解析はSeuratを用いた。データの正規化、変数の特徴選択、統合が行われた。次元削減と細胞のクラスタリングには、主成分分析と一様多様体の近似と射影（uniform manifold approximation and projection: UMAP）が用いられた。細胞タイプはマーカー発現プロファイルに基づいて同定された。発現変動遺伝子（DEG）は、Wilcoxon順位和検定を用いて同定した。可視化はggplot2を用いて行った。詳細な方法は以下に記載されている。

## [0073] 免疫プロテオミクス

Olink Target 96 InflammationおよびOlink Explore 384 Inflammationパ

ネル (Olink Proteomics, Uppsala, Sweden) を用いて、炎症に関連する400種類のヒト蛋白質 (表2) を同時に測定した。データは正規化蛋白質発現 (NPX) 値として示した。Rのstatsパッケージの "cor.test" 関数を用いて相関検定を行った。詳細な方法は以下に記載されている。

表2. 測定されたタンパク質のリスト\*

## [表2]

4EBP1, ACTN4, ADA, ADAM23, ADGRE2, AGER, AGRN, AGRP, ALDH3A1, AMBN, AMN, ANGPT1, ANGPTL2, ANGPTL4, ANXA11, AOC1, ARHGEF12, ARNT, ARTN, ATP5IF1, AXIN1, B4GALT1, BACH1, BANK1, BCR, BSG, BTN2A1, BTN3A2, C1QA, CASP2, CASP8, CCL11, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL28, CCL3, CCL4, CCL7, CCN2, CD160, CD200, CD200R1, CD22, CD244, CD276, CD4, CD40, CD40LG, CD48, CD5, CD58, CD6, CD70, CD79B, CD83, CD84, CD8A, CDCP1, CDON, CDSN, CEACAM21, CEP164, CHRDL1, CKAP4, CKMT1A, CKMT1B, CLEC4A, CLEC4C, CLEC4D, CLEC4G, CLEC7A, CLIP2, CLSTN2, CNTNAP2, COL9A1, COLEC12, CRELD2, CRHBP, CRIM1, CRKL, CRLF1, CSF1, CSF3, CST5, CST7, CTRC, CTSC, CTSO, CX3CL1, CXADR, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL14, CXCL17, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL9, DAG1, DAPP1, DBNL, DECR1, DFFA, DGKZ, DNER, DNPH1, DPP10, EDAR, EGF, EGLN1, EIF4G1, EIF5A, ENAH, ENPP5, ENPP7, ENRAGE, EPCAM, EPHA1, EPO, ERBB3, ESM1, F2R, FABP1, FABP9, FASLG, FCAR, FCRL2, FCRL3, FCRL6, FGF19, FGF2, FGF21, FGF23, FGF5, FIS1, FKBP1B, Flt3L, FLT3LG, FOXO1, FST, FSTL3, FXYD5, GAL, GALNT3, GBP2, GDNF, GLOD4, GMPR, GOPC, GZMA, GZMB, HCLS1, HEXIM1, HGF, HLADRA, HLAE, HPCAL1, HSD11B1, HSPA1A, ICA1, ICAM4, IDS, IFNG, IFNGamma, IFNGR1, IFNLR1, IKKBK, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL12B, IL12RB1, IL13, IL15, IL15RA, IL16, IL17A, IL17C, IL17D, IL17F, IL17RB, IL18, IL18R1, IL1A, IL1B, IL1R2, IL1RL2, IL1RN, IL2, IL20, IL20RA, IL22RA1, IL24, IL2RB, IL32, IL33, IL3RA, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL7, IL8, IRAK1, IRAK4, ISM1, ITGA11, ITGA6, ITGB6, ITM2A, JCHAIN, JUN, KLRB1, KLRD1, KRT19, KYNU, LAIR1, LAMA4, LAMP3, LAP, TGFbeta1, LAP3, LAT, LGALS4, LGALS9, LGMN, LHPP, LIFR, LILRB4, LRRN1, LSP1, LTA, LTBR, LTO1, LY6D, LY75, LY9, MANF, MAP2K6, MAPK9, MATN2, MCP1, MCP2, MCP3, MCP4, MEGF10, MEPE, MERTK, METAP1D, MGMT, MICB, MICA, MILR1, MLN, MMP1, MMP10, MPIG6B, MVK, MYO9B, MZB1, NBN, NCF2, NCK2, NCLN, NCR1, NELL2, NFASC, NFATC1, NFATC3, NME3, NPPC, NRTN, NT3, NT5C3A, NTF3, NUB1, NUDC, OMD, OPG, OSCAR, OSM, PADI2, PAPP, PARP1, PCDH1, PDGFB, PDL1, PDLIM7, PGF, PIK3AP1, PKLR, PLA2G4A, PLAUR, PLXNA4, PNLIPRP2, PNPT1, PON3, PPP1R9B, PRDX3, PRDX5, PREB, PRELP, PRKAB1, PRKCQ, PROK1, PRSS8, PSIP1, PSMG3, PSPN, PTH1R, PTPN6, PTPRM, PTX3, RAB37, RAB6A, RABGAP1L, REG4, RGS8, ROBO1, SAMD9L, SCF, SCG3, SCGB1A1, SCGB3A2, SCGN, SCRNI, SELPLG, SERPINB8, SH2D1A, SHMT1, SIGLEC1, SIGLEC10, SIRPB1, SIRT2, SIT1, SKAP2, SLAMF1, SLAMF7, SLC39A5, SMOC2, SMPDL3A, SPINK4, SPINT2, SPON1, SPRY2, SRPK2, ST1A1, STAMBP, STX8, SULT2A1, TANK, TBCLD5, TFF2, TGFA, TGFalpha, TGFB1, TIMP3, TLR3, TNF, TNFAIP8, TNFB, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF14, TNFRSF4, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF11, TNFSF12, TNFSF13, TNFSF14, TPPI, TPSAB1, TPT1, TRAF2, TRAIL, TRANCE, TREM2, TRIM21, TRIM5, TWEAK, uPA, VASH1, VEGFA, VEGFD, WAS, WFIKKN2, WNT9A, YTHDF3

\* これらのタンパク質は、Olink Target 96 InflammationおよびOlink Explore 384 Inflammationパネル (<https://olink.com>) に含まれている。

[0074] 酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)

血清リン酸化ニューロフィラメントH (pNf-H) レベルは、市販のELISAキット (EUROIMMUN, Luebeck, Germany) を用いて測定した。

#### [0075] 統計解析

統計解析はMicrosoft Rオープンソフトウェア (バージョン4.0.2) を用いて行った。scRNA-seqにおけるDEGは、ノンパラメトリックWilcoxon順位和検定で同定し、Bonferroniの検定を用いて多重検定を補正した。血清プロテオームにおけるDEPと、各細胞タイプの頻度における群間の差は、多重検定のためにTukeyの範囲検定を用いて同定した。相関検定はピアソンの相関係数を用いて行った。

#### [0076] 詳細な単一細胞RNA配列決定 (scRNA-seq)

PBMCの調製、ライブラリーの調製、配列決定

凍結保存したヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を37°C水で素早く溶解し、1% BSAを含む1x D-PBS (Mg/Caフリー) で洗浄した。細胞を回収するための遠心条件は、20°C、250 xg、スイングアウトローターで10分間であった。3回洗浄後、細胞を適量のD-PBS/1%BSAに再懸濁し、Flowmi Cell Strainer 40  $\mu$ mにかけ、残った大きな粒子を取り除いた。細胞数と生存率は、トリパンブルー染色を伴う血球計数器で調べた。

scRNA-seqは10x Genomicsプラットフォームを用いて行った。単細胞懸濁液 (10,000 個の細胞) を 10x Genomics Chromium コントローラーを用いて GEM 生成用チップにロードし、Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 (10x Genomics, Pleasanton, CA) を用いて、メーカーの指示に従って DNA ライブラリーを調製した。調製したライブラリーの品質管理は、シーケンス前に4200 TapeStation D1000 ScreenTape (Agilent, Santa Clara, CA) とQubit dsDNA Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いて行った。遺伝子発現ライブラリーは、DNBSEQ-G400プラットフォーム (MGI Tech, Shenzhen, China) を用いて、細胞あたり50,000リードの深さで配列決定した。

#### [0077] データの正規化

一次解析は10x Genomics Cell Ranger version 3パイプラインを用いて行った。bclファイルはCell Rangerの "counts" ソフトウェアを用いてFASTQ形式に変換した。FASTQデータをフィルターし、GRCh38参照ゲノムにマッピングした。二次解析はRバージョン4.0.2でSeuratバージョン3パッケージを用いて行った。SeuratおよびDoubletFinderパッケージを用いて、低品質細胞およびダブルット細胞のデータを除外した。これらのカウントは、Seuratの関数 "LogNormalize" でグローバルスケーリング正規化法を用いて正規化し、Seuratの関数 "NormalizeData" で対数変換した。変数特徴は、Seurat 関数 "FindVariableFeatures" を使用して固有の平均-分散関係の直接モデリングによって選択され、これらの特徴は、Seurat 関数 "SelectIntegrationFeatures" を使用して統合特徴を選択するために使用された。統合特徴を線形変換に適用し、それぞれSeuratの関数 "ScaleData" と "RunPCA" を使って主成分分析 (PCA) に使用した。相互PCAを使用して、上位50の主成分をアンカー識別に使用した。アンカーは、Seuratの関数 "IntegrateData" を用いてデータセットを統合するために用いられた。

#### [0078] 解析

統合された正規化データは、Seuratの関数 "ScaleData" と "RunPCA" を用いて線形変換とPCAを行った。重要な主成分は、主成分の標準偏差をプロットしたエルボープロットを用いて決定され、Seurat関数 "ElbowPlot" と "RunUMAP" を用いてUniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)を可視化するために採用された。重要な主成分は、細胞の種類を特定するためにも用いられた。まず、Seuratの関数 "FindNeighbors" を用いて、PCA空間におけるユークリッド距離と、局所近傍における共有重複に基づく任意の2つのセル間のエッジの重みに基づくKNNグラフによって、各セル間の類似性を計算した。次に、LouvainアルゴリズムとSeurat関数 "FindClusters" を用いてセル間の類似性をクラスタリングすることで、セルをクラスターに分割した。最後に、各クラスターにおける細胞種特異的マーカー発現プロファイルを調べることで、各クラスターにおける細胞種を同定した。各細胞型におけるグ

グループ間の発現変動遺伝子 (DEG) は、Seurat関数 "FindMarkers" を用いたノンパラメトリックWilcoxon順位和検定で同定した。各クラスターにおける遺伝子発現レベルは、Seurat関数 "VlnPlot" を用いてバイオリンプロットで可視化した。グループ間の各細胞タイプの頻度の差は、stats (Rデフォルト) パッケージの "TukeyHSD" 関数を用いて、Tukeyの範囲検定で同定した。相関検定は、stats (Rデフォルト) パッケージの "cor.test" 関数を用いて行った。散布図、箱ひげ図、棒グラフの可視化は、ggplot2パッケージを用いてRで行った。

#### [0079] 詳細な免疫プロテオミクス

Olink Target 96 InflammationおよびOlink Explore 384 Inflammationパネル (Olink Proteomics, Uppsala, Sweden) を用いて、炎症に関連する400種類のヒト蛋白質 (表2) を同時に測定した。測定はPEA技術に基づいて行われた (<https://www.olink.com>)。簡単に説明すると、ユニークなオリゴヌクレオチド (近接プローブ) にリンクされた抗体のマッチしたペアが、それぞれの蛋白質ターゲットに結合する。2つのプローブが近接したときのみ、互いにハイブリダイズし、二本鎖DNAが形成される。最後に、Olink Target 96 Inflammationパネルでは定量的リアルタイムPCRにより、Olink Explore 384 Inflammationパネルでは次世代シーケンシング (NGS) により、複合体が検出・定量された。データは正規化蛋白質発現 (NPX) 値として示され、これはOlink Proteomicsのlog2スケールでの任意単位である。NPX値はCT値 (quantitative real-time PCR) と合致したカウント数 (NGS) を用いて計算した。したがって、NPX値は絶対的な蛋白質レベルではなく、相対的な発現を表している。

分析した蛋白質については、NGSで測定した項目はすべて選択し、リアルタイムPCRのみで測定した項目については、検出限界以上のサンプルが50%以上あるものだけを選択した。stats (Rデフォルト) パッケージの "TukeyHSD" 関数を用いてTukeyの範囲検定を行い、グループ間の発現変動蛋白質 (DEP) を同定した。ボルケーノプロットはggplot2とggrepelパッケージを用いてRで作成した。散布図と箱ひげ図の可視化は、ggplot2パッケージを用いてRで行

った。相関検定は、stats (Rのデフォルト) パッケージの "cor.test" 関数を用いて行った。

[0080] 結果

臨床的特徴

スクリーニング対象のうち、10名の健常対照者および35名のALS患者からインフォームド・コンセントを得た; 1名の神経障害患者は登録されなかった。胃がん(n=1)、肝細胞がん(n=1)、HTLV-1(n=1)、SOD1(n=1)、ならびに肺がんおよびSOD1(n=1)を有した5名のALS患者は、除外された。最終的に、10名の健常対照者、23名の非急速ALS患者( $\Delta$ ALSFRS-R/月<1)、および7名の急速ALS患者( $\Delta$ ALSFRS-R/月 $\geq$ 1)の末梢血サンプルを分析した(表3)。ALS患者は、10.4 $\pm$ 6.4月の罹病期間および39.9 $\pm$ 5.2点の平均ALSFRS-Rを有した。臨床情報を、scRNA-seqおよびプロテオミクスのデータと比較した(図1A)。

表3. 40の対象の臨床的特徴

[表3]

	健常対照者 (n=10)	非急速ALS (n=23)	急速ALS (n=7)
年齢, 歳, 平均 $\pm$ SD	63.6 $\pm$ 10.2	60.7 $\pm$ 10.8	69.8 $\pm$ 14.4
男性, N (%)	7 (70.0)	17 (73.9)	3 (42.9)
エントリー時のALSFRS-R, 平均 $\pm$ SD*	-	41.8 $\pm$ 2.6	34.7 $\pm$ 7.1
エントリー前の期間, 月, 平均 $\pm$ SD*	-	12.4 $\pm$ 6.2	5.0 $\pm$ 2.5
$\Delta$ ALSFRS-R/月, 平均 $\pm$ SD*	-	0.56 $\pm$ 0.22	2.81 $\pm$ 1.27
発症部位, N (%)			
頰	-	8 (34.8)	2 (28.6)
肢	-	14 (60.9)	5 (71.4)
胴体	-	1 (4.3)	0 (0.0)
%FVC, 平均 $\pm$ SD	-	87.6 $\pm$ 22.7	61.5 $\pm$ 41.0
認知状態, N (%)			
正常	10 (100.0)	21 (91.3)	4 (57.1)
障害	-	2 (8.7): FTD, 2	3 (42.9): FTD, 1; FTDの疑い, 1; 病因不明, 1

ALS = 筋萎縮性側索硬化症、ALSFRS-R = 改訂筋萎縮性側索硬化症機能評価尺度

、FVC＝強制生命維持能力、FTD＝前頭側頭型認知症、SD＝標準偏差、\* $p < 0.05$  (非急速ALS 対 急速ALS、t検定)。

[0081] scRNA-seq解析によりALSにおける免疫細胞の変化が明らかになった

統合されたscRNA-seqデータを23の細胞タイプに分類し(図5)、さらなる解析のために選択した(図1B)。Tヘルパー2細胞(Th2)をクラスターとして分離しなかった。免疫プロファイルを調べるため、まず、対照、非急速ALS、および急速ALSの全細胞における細胞タイプの頻度を計算した(図1Cおよび図6)。Tregの数は、対照および急速ALSと比較して、非急速ALSで有意に増加した(それぞれ2.4%対1.9%、 $p=0.011$ 、および2.4%対1.6%、 $p=0.029$ ; 図2A)。次に、全CD4 T細胞における関連した細胞の細胞タイプ、例えばナイーブCD4 T細胞、メモリーCD4 T細胞、Th1、Th17、またはTregの頻度を計算した(図7)。全CD8 T細胞中の成熟CD8 T細胞の頻度は、急速ALSにおいて非急速ALSより有意に高かった(91.6%対82.2%、 $p=0.042$ )。一方、全B細胞における制御性B細胞の頻度は、急速ALSにおいて非急速ALSより有意に低く(5.5%対7.3%、 $p=0.048$ )、全CD8 T細胞におけるナイーブCD8 T細胞および疲弊CD8 T細胞の頻度は、急速ALSにおいて非急速ALSより有意に低かった(それぞれ4.1%対8.4%、 $p=0.010$ 、および0.6%対0.9%、 $p=0.042$ ) (図2B)。一方、全CD4 T細胞において、急速ALSと非急速ALS間のTregの頻度に有意差はなかった(6.8%対8.5%、 $p=0.31$ ; 図7)。

さらに、機能的に関連する免疫細胞間の頻度比を計算した(図8)。メモリーCD4 T細胞/Treg(4.9対2.9、 $p=0.022$ )、Th1/Treg(1.9対1.2、 $p=0.016$ )、Th17/Treg(1対0.6、 $p=0.0049$ )、成熟CD8 T細胞/ナイーブCD8 T細胞(23.0対9.8、 $p=0.012$ )、成熟CD8 T細胞/疲弊CD8 T細胞(149.7対89.9、 $p=0.016$ )、および成熟ナチュラルキラー細胞/ナイーブナチュラルキラー細胞(28.1対20.1、 $p=0.042$ )の比は、急速ALSにおいて非急速ALSより有意に高かった(図2C)。これらの結果は、急速ALSおよび非急速ALSの免疫学的プロファイルが異なることを示した。

[0082] 免疫細胞の頻度は進行速度と相関していた

次に、30人のALS患者について、各細胞タイプの頻度と $\Delta$ ALSFRS-R/月との関係を調べた。 $\Delta$ ALSFRS-R/月と年齢との間には有意な相関があり（ピアソンの相関係数=0.421、 $p=0.021$ ）、そしてルーチンの相関分析において年齢との交絡が無視できないため、偏相関を用いた。全細胞におけるTregは、進行速度と負の相関を示す傾向があったが、有意ではなかった（係数=-0.351、 $p=0.062$ ）（表4）。一方、CD4 T細胞におけるTh17の頻度は、 $\Delta$ ALSFRS-R/月と有意に相関していた（係数=0.3898、 $p=0.0366$ ；表5）。さらに、メモリーCD4 T細胞/Treg(係数=0.450、 $p=0.014$ )およびTh17/Treg(係数=0.428、 $p=0.021$ )の比は、 $\Delta$ ALSFRS-R/月と有意に相関していた(表6)。

表4. 全細胞における各細胞タイプの頻度と $\Delta$ ALSFRS-R/月との偏相関解析

[表4]

細胞タイプ	偏相関係数	P値
Treg	-0.351	0.062
典型的な DC	-0.249	0.193
Th17	0.246	0.198
成熟 CD8 T	0.235	0.220
ナイーブ NK	-0.188	0.329
ナイーブ B	-0.177	0.358
ナイーブ CD4 T	-0.176	0.362
疲弊 CD8 T	-0.166	0.390
形質細胞様DC	-0.163	0.400
Breg	-0.157	0.416
Th1	0.145	0.453
メモリー CD8 T	0.144	0.456
マクロファージ	-0.126	0.516
$\gamma$ $\Delta$ T	-0.118	0.541
古典的な単球	0.115	0.553
メモリーCD4 T	0.100	0.606
成熟 NK	-0.084	0.667
メモリー B	-0.073	0.707
非古典的な単球	0.056	0.771
活性化NK	-0.053	0.787
血漿	0.046	0.814
ナイーブ CD8 T	-0.018	0.925
血小板	0.011	0.956

DC = 樹状細胞、NK = ナチュラルキラー。

表5. 各免疫細胞における細胞タイプ頻度と $\Delta$ ALSFRS-R/月との偏相関解析

[表5]

集団	細胞タイプ	偏相関係数	P値
CD4 T	Th17	0.3898	0.0366
CD4 T	メモリーCD4 T	0.3338	0.0768
T	CD8 T	0.3061	0.1063
T	CD4 T	-0.3051	0.1075
CD4 T	ナイーブ CD4 T	-0.2689	0.1584
CD8 T	疲弊 CD8 T	-0.2459	0.1984
B	Breg	-0.2291	0.2319
CD4 T	Th1	0.2169	0.2585
CD4 T	Treg	-0.2012	0.2952
B	メモリー B	0.1948	0.3112
NK	ナイーブ NK	-0.1636	0.3966
B	ナイーブ B	-0.1565	0.4177
T	$\gamma$ $\Delta$ T	-0.1080	0.5772
CD8 T	成熟 CD8 T	0.1079	0.5775
NK	活性化NK	0.0971	0.6165
CD8 T	ナイーブ CD8 T	-0.0921	0.6348
単球	古典的な単球	0.0694	0.7207
単球	非古典的な単球	-0.0694	0.7207
NK	成熟 NK	0.0326	0.8666
DC	典型的な DC	-0.0058	0.9760
DC	形質細胞様DC	0.0058	0.9760
CD8 T	メモリー CD8 T	-0.0002	0.9991

DC = 樹状細胞、NK = ナチュラルキラー。

表6. 頻度比と $\Delta$ ALSFRS-R/月との偏相関解析

[表6]

細胞タイプ	偏相関係数	P値
メモリーCD4 T / Treg	0.450	0.014
Th17 / Treg	0.428	0.021
Th1 / Treg	0.350	0.063
ナイーブ CD4 T / メモリーCD4 T	-0.315	0.096
CD4 T / CD8 T	-0.307	0.105
成熟 CD8 T / 疲弊 CD8 T	0.278	0.144
ナイーブ CD8 T / 成熟 CD8 T	-0.242	0.206
メモリー B / Breg	0.233	0.224
ナイーブ NK / 活性化NK	-0.185	0.336
ナイーブ NK / 成熟 NK	-0.180	0.350
疲弊 CD8 T / メモリー CD8 T	-0.153	0.428
ナイーブ B / メモリー B	-0.150	0.438
成熟 CD8 T / メモリー CD8 T	0.138	0.474
ナイーブ CD8 T / メモリー CD8 T	-0.111	0.568
ナイーブ B / Breg	0.087	0.653
古典的な単球 / 非古典的な単球	0.054	0.780
ナイーブ CD4 T / Treg	-0.026	0.894
典型的な DC / 形質細胞様DC	0.025	0.898
ナイーブ CD8 T / 疲弊 CD8 T	0.005	0.981

DC = 樹状細胞、NK = ナチュラルキラー。

[0083] ALSの免疫細胞において発現が異なる遺伝子はほとんどなかった

ALSと免疫細胞の質的変化との関連についても調べた。各グループにおける全体的な質的変化を理解するために、scRNA-seqデータを用いてDEG解析を行った。ALS 対 対照、非急速ALS 対 対照、急速ALS 対 対照、および急速ALS 対 非急速ALSの間でscRNA-seqデータの差次的発現解析を行い、次に23の細胞タイプにおいてDEGを単離した(Bonferroni調整 $p < 0.05$ 、倍数変化 $\geq 1.2$ )。しかしながら、それぞれの比較で同定されたDEGは少なく、免疫関連遺伝子であることが知られているものはなかった(表7)。

表7. 差次発現遺伝子の数のリスト

[表7]

細胞タイプ	ALS 対 対照	非急速ALS 対 対照	急速ALS 対 対照	急速ALS 対 非急速ALS
ナイーブ B	0	0	0	0
メモリー B	0	0	1	0
Breg	0	0	0	0
血漿	0	0	0	0
ナイーブ CD4 T	1	1	1	0
メモリーCD4 T	0	0	0	0
Th1	0	0	1	0
Th17	0	0	0	0
Treg	0	0	0	0
ナイーブ CD8 T	0	0	0	0
成熟 CD8 T	0	0	0	0
メモリー CD8 T	0	0	0	0
疲弊 CD8 T	0	0	0	0
$\gamma$ $\Delta$ T	0	0	1	0
ナイーブ NK	0	0	0	0
成熟 NK	0	0	0	0
活性化NK	0	0	0	0
古典的な単球	1	1	1	0
非古典的な単球	0	0	0	0
マクロファージ	1	1	1	0
典型的な DC	0	0	0	0
形質細胞様DC	0	0	1	0
血小板	9	6	10	0

ALS = 筋萎縮性側索硬化症、DC = 樹状細胞、NK = ナチュラルキラー。

[0084] 免疫関連タンパク質は進行速度と相関していた

キラー細胞レクチン様受容体D1(KLRD1; 倍数変化=2.2、 $p<0.001$ )、トレフォイルファクター2(TFF2; 倍数変化=2.3、 $p<0.001$ )、ケラチン19(KRT19; 倍数変化=3.2、 $p<0.001$ )、インターロイキン-17A (IL-17A; 倍数変化=4.8、 $p=0.007$ )、YTH N6-メチルアデノシンRNA結合タンパク質F3(YTHDF3; 倍数変化=2.6、 $p=0.025$ )、および好中球細胞質因子2(NCF2; 倍数変化=2.4、 $p=0.041$ )が、急速 対 非急速ALSにおいて有意に上昇していることが同定された。これらのうち、KLRD1(倍数変化=2.2、 $p<0.001$ )、KRT19(倍数変化=2.7、 $p=0.01$ )、NCF2(倍数変化=3.0、 $p=0.018$ )、YTHDF3(倍数変化=3.0、 $p=0.017$ )、およびIL-17

A(倍数変化=4.0、 $p=0.037$ )も、急速ALS 対 対照において有意に上昇していた(図3A, B)。pNf-Hの発現レベルは、ALS(非急速 + 急速ALS) 対 対照(倍数変化=180、 $p=0.001$ )においておよび急速ALS 対 対照(倍数変化=3074、 $p<0.001$ )において有意に高く(図3A, C)、これらのことは我々のサンプルの妥当性を支持した。一方、pNf-Hレベルは急速ALSと非急速ALS間で差がなかったことから、pNf-HはALSにおける進行速度に非特異的であることが示唆された。

さらに、測定されたタンパク質が疾患の進行と相関しているかどうかを調べるために、血清タンパク質レベルと $\Delta$ ALSFRS-R/月との偏相関分析を行った。82のタンパク質が、 $\Delta$ ALSFRS-R/月と有意な偏相関を有した(表8)。急速ALS

対 非急速ALSまたは対照において有意に上昇した全6つのDEPは、有意な偏相関を有し、特にKLRD1、KRT19、およびIL-17Aは、0.5以上の係数および0.003以下のp値であった。IL-17CおよびIL-12受容体サブユニット $\beta$ 1は、より少ない偏相関を示した(それぞれ、係数=0.416および $p=0.031$ 、係数=0.383および $p=0.049$ )。一方、IL-17D、IL-17F、およびIL-17受容体Bは、有意な相関を示さなかった。

表8. 血清プロテオームと $\Delta$ ALSFRS-R/月との偏相関解析

[表8-1]

タンパク質	偏相関係数	P値	タンパク質	偏相関係数	P値	タンパク質	偏相関係数	P値
KLRD1	0.745	0.000	B4GALT1	0.483	0.008	WNT9A	0.428	0.026
CEP164	0.697	0.000	PLAUR	0.483	0.008	PTPRM	0.424	0.027
CD160	0.665	0.000	IL2	0.498	0.008	LILRB4	0.424	0.027
KRT19	0.658	0.000	NCF2	0.498	0.008	CCL25	0.412	0.029
TNFRSF11A	0.644	0.000	IFNGR1	0.478	0.009	TNFRSF11B	0.402	0.031
CD79B	0.610	0.001	TNFRSF13B	0.477	0.009	IL17C	0.416	0.031
CLEC7A	0.594	0.001	YTHDF3	0.492	0.009	GOPC	0.410	0.033
TFF2	0.584	0.001	HCLS1	0.481	0.010	CD83	0.410	0.034
CKAP4	0.585	0.001	PPP1R9B	0.475	0.011	IL18R1	0.399	0.035
CSF1	0.554	0.002	ADGRE2	0.467	0.011	NRTN	0.406	0.036
F2R	0.550	0.002	LTBR	0.467	0.011	LY6D	0.391	0.036
BTN3A2	0.563	0.002	LSP1	0.481	0.011	RAB37	0.401	0.038
IL17A	0.556	0.003	FOXO1	0.478	0.012	CRELD2	0.386	0.038
LAIR1	0.536	0.003	SAMD9L	0.477	0.012	IL4R	0.400	0.039
IKBKG	0.548	0.003	TNFRSF14	0.459	0.012	SIGLEC10	0.399	0.039
CD4	0.541	0.004	SRPK2	0.475	0.012	JUN	0.393	0.042
NPPC	0.540	0.004	ITM2A	0.467	0.014	MZB1	0.378	0.043

[表8-2]

COL9A1	0.538	0.004	COLEC12	0.443	0.016	ITGA11	-0.390	0.045
FCRL6	0.533	0.004	CD40	0.437	0.018	IDS	-0.381	0.045
CEACAM21	0.531	0.004	LIFR	0.453	0.018	CTSO	0.379	0.047
CCL23	0.512	0.004	PTPN6	0.435	0.018	TNFSF10	0.378	0.047
SERPINB8	0.518	0.005	TNFSF13	0.431	0.019	SCGN	0.384	0.048
FSTL3	0.504	0.005	CHRD1	0.429	0.020	IL12RB1	0.383	0.049
BACH1	0.518	0.006	EGLN1	0.442	0.021	OSCAR	0.368	0.049
GAL	-0.492	0.007	TNFB	-0.475	0.022			
ESM1	0.491	0.007	LGALS9	0.424	0.022			
FLT3LG	-0.498	0.007	IL10RB	0.420	0.023			
AGRN	0.490	0.007	PSIP1	0.432	0.025			
KLRB1	0.497	0.007	LGALS4	0.415	0.025			

[0085] scRNA-seqおよび血清イムノプロテオミクスの結果は相関していた

scRNA-seqおよびイムノプロテオミクスの統合解析として、血清タンパク質の発現レベルとscRNA-seq解析において解析した各細胞タイプの頻度/比との相関解析を行った(表9)。>0.5の相関係数で非急速ALSまたは対照と比較して急速ALSにおいて有意に増加したDEPおよび細胞タイプの組合せは、NCF2-古典的な単球、TFF2-成熟CD8 T細胞、KLRD1-成熟CD8 T細胞、IL-17A-メモリーCD4 T細胞、およびIL-17A-Th17であった(図4)。

表9. scRNA-seqにおける血清プロテオームと細胞タイプとの相関性

[表9-1]

全細胞において			細胞サブセットにおいて		
タンパク質	細胞タイプ	相関	タンパク質	細胞タイプ	相関
HGF	古典的な単球	0.756	BTN3A2	メモリーCD4T	0.620
OSM	ナイーブ CD4T	-0.660	IL2RB	Th17	0.601
OSM	古典的な単球	0.641	PCDH1	Treg	-0.594
TGFalpha	古典的な単球	0.628	OSM	ナイーブ CD4T	-0.578
TGFA	古典的な単球	0.606	KYNU	Treg	0.570
PRKAB1	ナイーブ NK	0.597	CLEC4C	gdT	0.567
HGF	ナイーブ CD4T	-0.592	BTN3A2	ナイーブ CD4T	-0.563
NCF2	古典的な単球	0.591	IL17A	メモリーCD4T	0.559
IL1RN	ナイーブ CD4T	-0.586	PADI2	成熟 NK	-0.559
IL1RN	古典的な単球	0.580	FGF21	Treg	0.557
TPSAB1	典型的な DC	-0.578	TFF2	成熟 CD8T	0.556

[表9-2]

全細胞において			細胞サブセットにおいて		
TNFRSF11 B	ナイーブ CD 8T	-0.574	TNFRSF11 B	成熟 CD8T	0.556
TGFA	ナイーブ CD 4T	-0.573	PLAUR	メモリーCD4T	0.555
CLEC4D	古典的な単球	0.563	CSF3	Th17	0.551
TFF2	ナイーブ CD 8T	-0.556	TFF2	ナイーブ CD8T	-0.548
IFNLR1	Th17	-0.556	TNFRSF14	メモリーCD4T	0.547
TNFRSF11 B	Breg	-0.550	SPRY2	gdT	0.545
IFNLR1	メモリーCD4 T	-0.549	LILRB4	メモリーCD4T	0.542
CASP8	マクロファージ	0.548	FSTL3	メモリーCD4T	0.537
EGLN1	古典的な単球	0.542	F2R	メモリーCD4T	0.536
Flt3L	成熟 CD8T	-0.538	TGFA	gdT	0.536
SRPK2	古典的な単球	0.532	IL18	gdT	0.535
TGFalpha	ナイーブ CD 4T	-0.531	GZMB	Treg	0.532
TNFRSF11 B	ナイーブ B	-0.530	OSM	メモリーCD4T	0.530
ROBO1	メモリーCD4 T	-0.529	PLAUR	ナイーブ CD4T	-0.528
CCL25	ナイーブ CD 8T	-0.528	HGF	古典的な単球	0.528

[表9-3]

全細胞において			細胞サブセットにおいて		
TNFSF14	古典的な単球	0.524	HGF	非古典的な単球	-0.528
LTA	gdT	0.524	IL17A	Th17	0.527
CCN2	血小板	0.524	TNFRSF9	gdT	0.527
BACH1	古典的な単球	0.516	HGF	ナイーブ CD4T	-0.526
TREM2	ナイーブ CD8T	-0.515	IL18	Treg	0.525
NBN	古典的な単球	0.513	CEACAM2 1	メモリーCD4T	0.517
IL1R2	メモリーCD4 T	-0.511	CDCP1	メモリー CD8T	-0.517
LAT	Breg	0.511	CDCP1	成熟 CD8T	0.515
PLAUR	古典的な単球	0.509	CRIM1	メモリーCD4T	0.514
HCLS1	古典的な単球	0.507	TLR3	活性化NK	-0.514
LSP1	古典的な単球	0.505	KLRD1	成熟 CD8T	0.513
LSP1	ナイーブ CD4T	-0.503	IFNgamma	古典的な単球	-0.511
SPRY2	成熟 CD8T	-0.501	IFNgamma	非古典的な単球	0.511
FGF5	ナイーブ CD8T	-0.501	LRRN1	成熟 CD8T	-0.510
			SULT2A1	Treg	0.509
			IL1RN	Treg	0.508
			IL4R	メモリーCD4T	0.504

[表9-4]

細胞サブセット間の比において		
タンパク質	細胞タイプ	相関
TFF2	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.652
BTN3A2	ナイーブ CD4T / メモリーCD4T	-0.612
TNFRSF11B	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.606
SPINT2	ナイーブ CD8T / 疲弊 CD8T	-0.603
TNFRSF11B	ナイーブ CD8T / 疲弊 CD8T	-0.585
PCDH1	メモリーCD4T / Treg	0.584
PCDH1	Th17 / Treg	0.578
ESM1	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.573
IL1RN	ナイーブ CD4T / Treg	-0.566
OSM	ナイーブ CD4T / Treg	-0.566
MLN	ナイーブ CD8T / 疲弊 CD8T	-0.563
IL17A	ナイーブ CD4T / メモリーCD4T	-0.561
HGF	ナイーブ CD4T / Treg	-0.559
OSM	ナイーブ CD4T / メモリーCD4T	-0.558
PLAUR	ナイーブ CD4T / メモリーCD4T	-0.556
BTN3A2	ナイーブ CD8T / 疲弊 CD8T	-0.554
CDCP1	ナイーブ CD4T / Treg	-0.552
IFNGR1	メモリーCD4T / Treg	0.547

[表9-5]

細胞サブセット間の比において		
KLRD1	成熟 CD8T / 疲弊 CD8T	0.546
KLRD1	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.545
KYNU	メモリーCD4T / Treg	-0.540
GZMB	Th1 / Treg	-0.540
TNFRSF9	ナイーブ CD8T / 疲弊 CD8T	-0.536
CD200	メモリーCD4T / Treg	0.532
F2R	ナイーブ CD4T / メモリーCD4T	-0.530
DECRI	ナイーブ NK / 活性化NK	0.527
CSF1	成熟 CD8T / メモリー CD8T	0.525
CCL25	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.524
TNFRSF14	ナイーブ CD4T / メモリーCD4T	-0.523
CRIM1	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.522
HGF	ナイーブ CD4T / メモリーCD4T	-0.520
LIFR	ナイーブ B / Breg	0.518
TREM2	ナイーブ CD4T / Treg	-0.516
TFF2	ナイーブ CD8T / 疲弊 CD8T	-0.514
MILR1	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.512
HGF	古典的な単球 / 非古典的な単球	0.512
CSF1	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.512
CEACAM21	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.511
F2R	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.511
PCDH1	Th1 / Treg	0.509
BTN3A2	ナイーブ CD4T / Treg	-0.506
KYNU	Th1 / Treg	-0.505
BTN3A2	ナイーブ CD8T / 成熟 CD8T	-0.503

## [0086] 考察

本試験において、マルチオミクス(multi-omics)を末梢免疫プロファイリングに適用し、ALS患者における免疫学的変化が疾患進行速度とどのように関連しているかを決定した。scRNA-seqにより、急速に進行するALSにおいて、Th17 対 Treg、成熟CD8 T細胞 対 ナイーブCD8 T細胞、および成熟ナチュラルキラー細胞 対 ナイーブナチュラルキラー細胞への細胞タイプのシフトが明らかになった。血清イムノプロテオミクスにより、Th17関連タンパク質およびCD8 T細胞関連タンパク質が急速に進行するALSにおいて有意に上昇し、疾患進行速度と相関していることが明らかになった。最後に、scRNA-seqお

よび免疫プロテオミクスの統合解析において、Th17とIL-17A、成熟CD8 T細胞とKLRD1など、特定の免疫細胞とタンパク質との間でダイナミックな関連性が示された。

[0087] Th17は、多くの病原体に対する免疫を促進することができるが、感染症および自己免疫中の炎症性病態も促進し得る。PBMCを用いたフローサイトメトリ解析の数少ない研究から、ALS患者が健常対照者と比べてTh1およびTh17の高い頻度、およびTh2およびTregの低い頻度を有することが示された。しかしながら、これまでの試験では、Th17とALSの進行速度との関係は明らかにされていなかった。今回、我々は、CD4 T細胞におけるTh17の増加がALSの急速な進行に関連することを示した。また、Th17とTregとの比および進行速度の間の有意な相関も明らかにした。一方、Tregの頻度のみでは、進行速度との有意な相関は示さなかった。したがって、ALSの急速な進行には、Tregの単なる減少ではなく、Tregと比較してのTh17へのシフトが重要であろう。

[0088] Tregの頻度は、急速ALS 対 非急速ALSでは有意に減少していたが、急速ALSと対照との間では差がなかった。また、上記のように、Tregの頻度は進行速度とは有意な相関を示さなかった。これらの結果は、Tregの減少が主に急速な進行に関連するという考え方とは合致しない。Tregを用いたALSの臨床試験の結果が報告されている。急速に進行する場合、IL-17CおよびIL-17Fが上昇し、進行およびサイトカインレベルはTreg投与によって抑制されなかった。このことは、IL-17サイトカインファミリーの上昇に伴う急速な進行に対して、Tregはほとんど効果がないことを示唆している。

[0089] プロテオミクス解析によって、KLRD1、TFF2、KRT19、IL-17A、YTHDF3、およびNCF2が、急速ALS 対 非急速ALSにおいて亢進していることが明らかになった。これらのほとんどは、scRNA-seqで解析された特定の細胞タイプの頻度とも相関していた。第一に、IL-17Aの値はメモリーCD4 T細胞およびTh17の頻度と相関しており、Th17がその主要なエフェクターであるIL-17Aを介して疾患進行に実際に影響を与えていることを示唆する。血清またはCSF中のTh17の増加またはIL-17Aの上昇は報告されているが、急速な進行とこれらとの関

連は不明なままであった。本研究では、scRNA-seqおよびイムノプロテオミクスを用いた包括的解析により、Th17およびIL-17A（IL-17Fは含まないが）をALSの急速な進行と関連付けることに成功した。さらに注目すべきは、IL-17Aシグナル伝達経路が乳がんの発症においてKRT19の制御と関連していることが報告されている。

[0090] 第二に、KLRD1の値は、400の免疫タンパク質の中で進行速度と最も高い偏相関係数を示し、成熟CD8 T細胞の頻度と相関していた。この結果は、急速ALSにおいて成熟CD8 T細胞の頻度が増加することと一致している。これと同様に、KLRD1はALS患者 対 対照のCSF中の活性化CD8 T細胞において異なって発現される遺伝子の一つとして報告されている。TFF2の値も成熟CD8 T細胞の頻度と相関している。これまでの研究で、ALS患者ではCD8 T細胞が増加していることが示されており、CD8 T細胞の割合が高いほどALSの死亡リスクが高いことが示されているが、CD8 T細胞とALSの進行との関係は不明であった。このような状況を鑑みると、血液およびCNS中の自己反応性由来の、クローン拡大した、末端分化エフェクターメモリー (T<sub>EMRA</sub>) CD8 T細胞が、セナタキシン (senataxin) 遺伝子 (SETX) の変異により引き起こされるマウスおよびヒトのALS4と関連していることは注目に値する。これらを総合すると、CD8 T細胞の特定のタイプがALSの進行または病態生理に関与している可能性があり、さらなる研究が必要である。

[0091] 第三に、NCF2の値は、古典的な単球の頻度と相関していた。NCF2は、好中球におけるスーパーオキシドの合成に関与しており、ALSおよび対照において異なって発現されるフェロトーシス (ferroptosis) および鉄代謝関連遺伝子の一つとして報告されている。単球に関して、単球と進行速度との関連は示されていなかったが、古典的単球と非古典的単球との比率がALS患者において上昇していることが報告されている。

[0092] 本研究のいくつかの制限を記す。第一に、患者は日本の様々な地域から呼ばれたが、参加者は単一施設で募集された。参加者の数は比較的少なかったが、scRNA-seqの他の最近の試験と同程度であった。第二に、登録時にALSの

家族歴がない患者は孤発性と分類され、遺伝子検査は必ずしも行われなかった。その結果、2人の患者がSOD1-ALSを有することが判明し、同じ家族からであったため、解析から除外された。一方、C9orf72-ALSの可能性は日本での症例では極めて低かった。第三に、急速ALSにおいて非急速ALSよりも、罹病期間が短く、登録時のALSFRS-Rスコアが低かった。短期間での急速な進行とより重度な症状との関連は妥当なものであったが、これらは交絡因子である可能性がある。第四に、上記の問題に関連して、長期的な評価は本研究の範囲外であった。異なる段階における追加的な評価により、ALSにおける免疫プロファイルの時間的、進行的変化がより明確になるであろう。

[0093] 要約すると、scRNA-seqとPEAに基づく免疫プロテオミクスのマルチオミクスにより、ALS患者における、急速な進行と、末梢血中のTh17 対 Treg、成熟CD8 T細胞 対 ナイーブCD8 T細胞、IL-17A関連タンパク質、およびCD8 T細胞関連タンパク質の増加との間の明確な関連を証明した。また、特定の細胞タイプと関連する免疫タンパク質との対応関係も示された。これらの結果は、ALSの疾患修飾療法の有望な標的およびバイオマーカーを提供することができる。

### 産業上の利用可能性

[0094] 本発明により、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の、進行速度または罹患の可能性を決定または診断することにおける、および／または治療薬を選択または予測することにおける、使用のためのバイオマーカーを提供することができる。本発明は、医療分野等において利用可能である。

## 請求の範囲

- [請求項1] 筋萎縮性側索硬化症（ALS）の、進行速度または罹患の可能性を決定または診断することにおける、および／または治療薬を選択または予測することにおける、使用のためのバイオマーカーであって、バイオマーカーは、IL-17A、KLRD1、KRT19、NCF2、TFF2、YTHDF3、Th17、制御性T細胞（Treg）、成熟（mature）CD8T、ナイーブ（naive）CD8T、疲弊（exhausted）CD8T、Classical monocyte、メモリー（memory）CD4T、Th17/Treg、mature CD8T/naive CD8T、およびmature CD8T/exhausted CD8Tからなる群から選択される、バイオマーカー。
- [請求項2] 急速の進行速度の筋萎縮性側索硬化症（ALS）を決定または診断することにおける使用のための、請求項1に記載のバイオマーカー。
- [請求項3] バイオマーカーが、IL-17AおよびTh17、IL-17Aおよびmemory CD4T、KLRD1およびmature CD8T、TFF2およびmature CD8T、ならびにNCF2およびClassical monocyteからなる組合せから選択される、請求項1に記載のバイオマーカー。
- [請求項4] 対象における筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行速度または罹患の可能性を決定または診断するための方法であって、前記対象由来のサンプル中の請求項1から3のいずれかに記載のバイオマーカーのレベルを決定することを含む、方法。
- [請求項5] 前記バイオマーカーの参照レベルに基づいて、ALSの進行速度または罹患の可能性を決定または診断することをさらに含む、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 参照レベルが、ALSを有さない対象由来のサンプル、ALSを有する対象由来のサンプル、非急速の進行速度のALSを有する対象由

来のサンプル、または急速の進行速度のALSを有する対象由来のサンプル中の前記バイオマーカーのレベルである、請求項5に記載の方法。



Figure 1

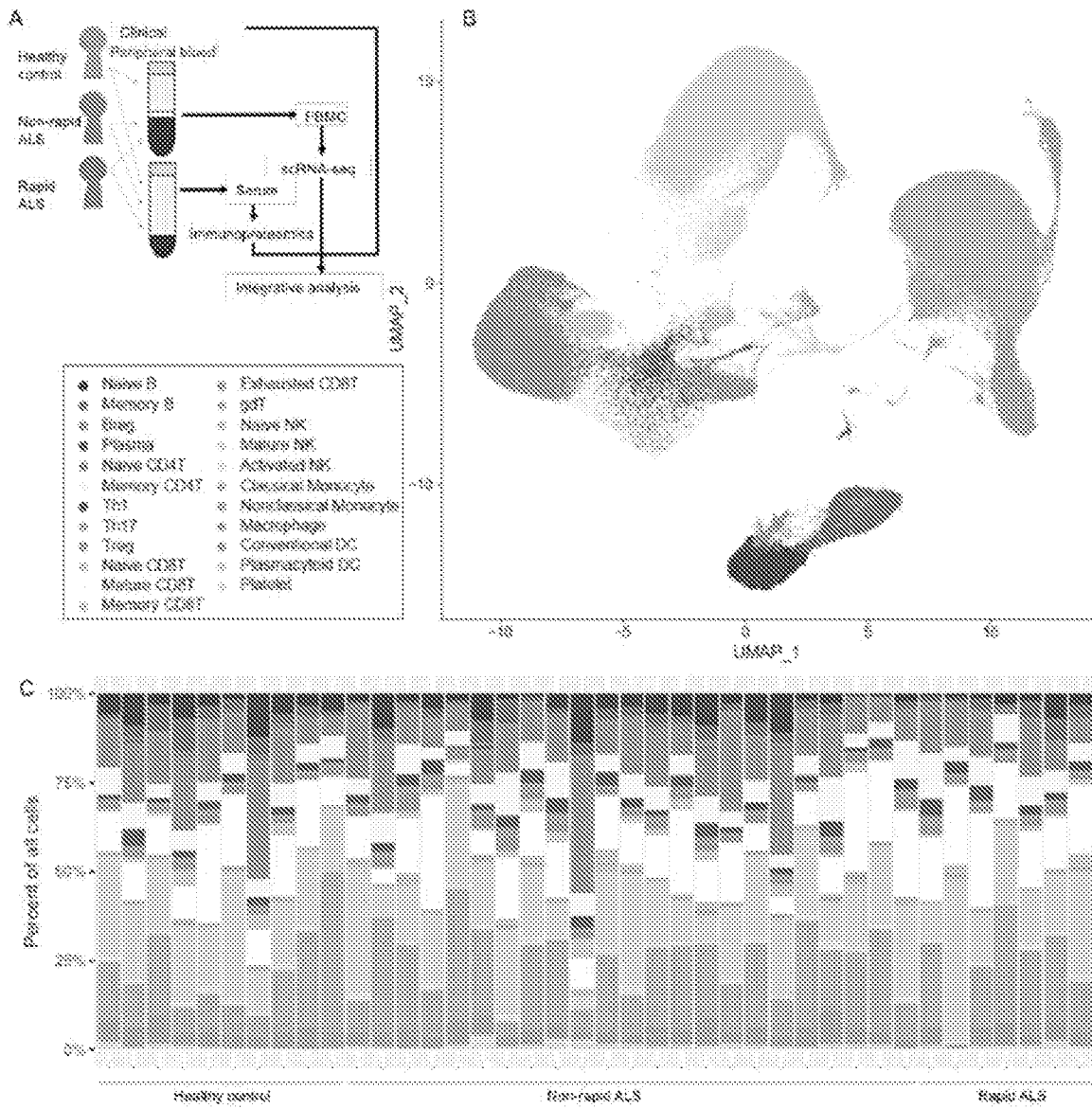
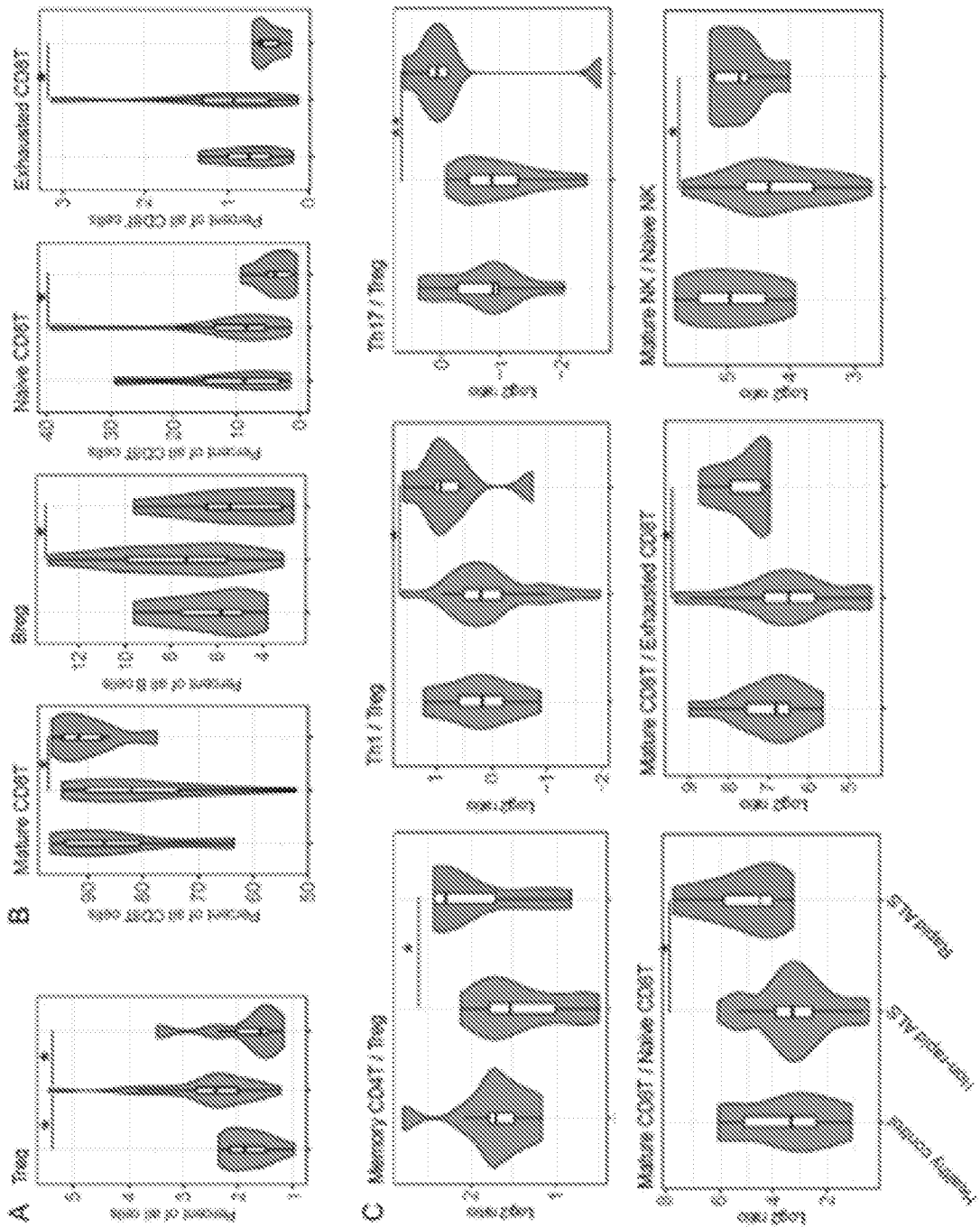


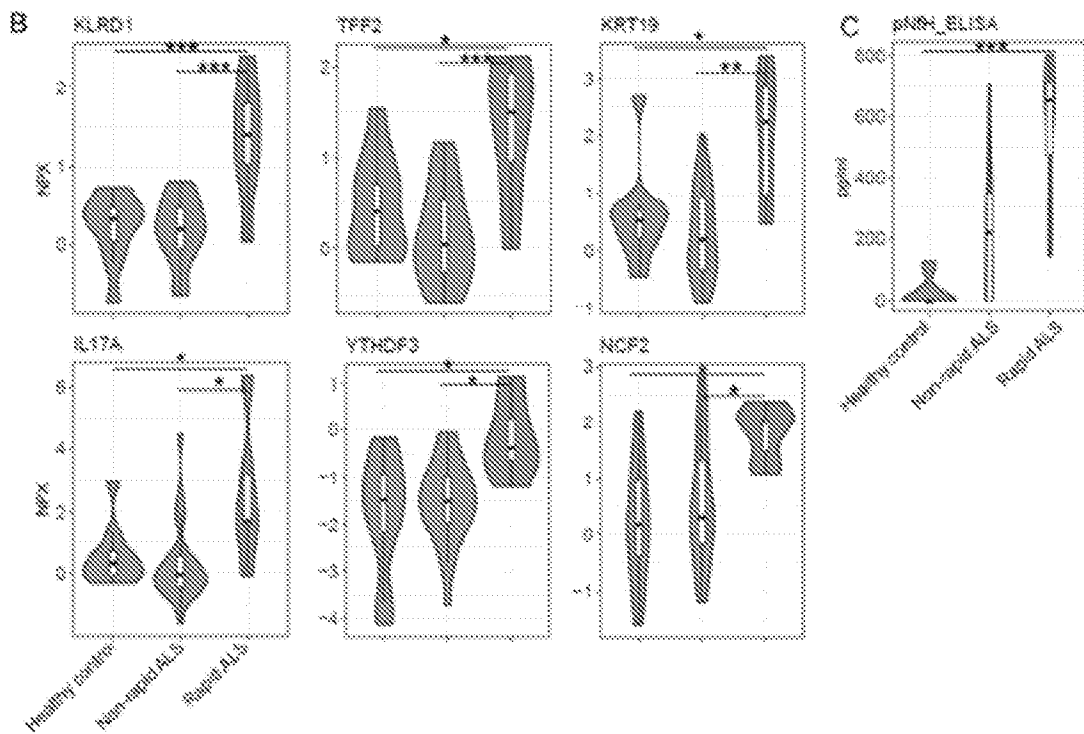
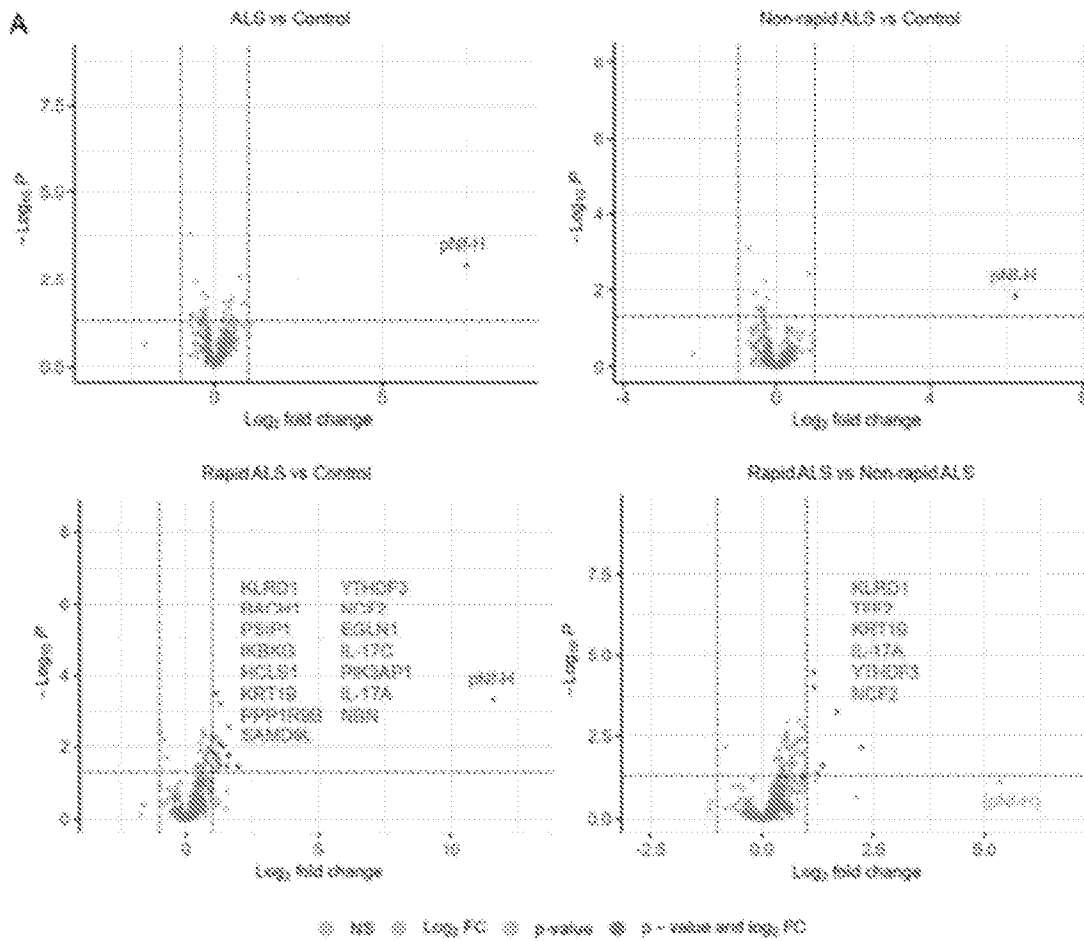


Figure 2



[Figure 3]

Figure 3



[圖4]

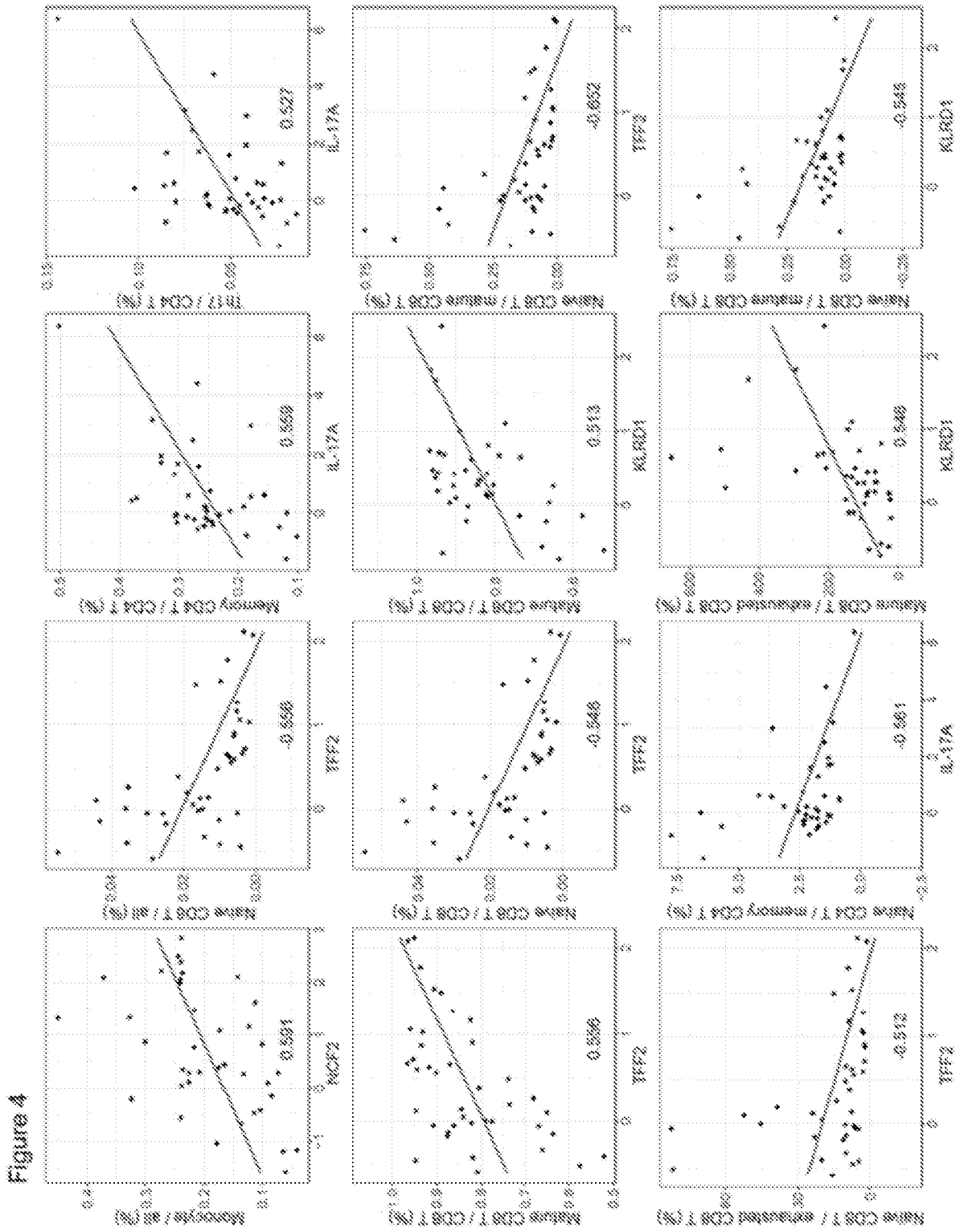
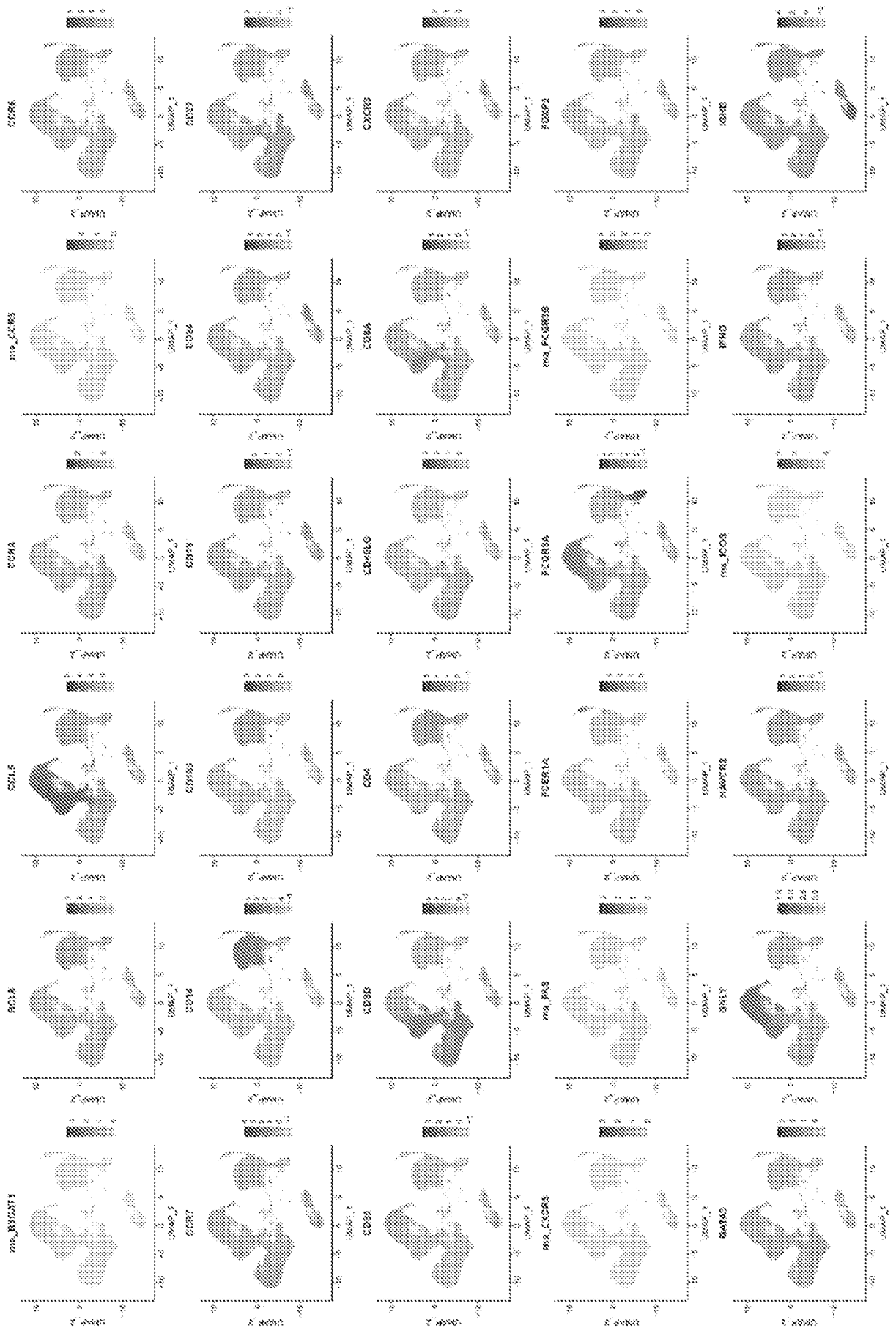
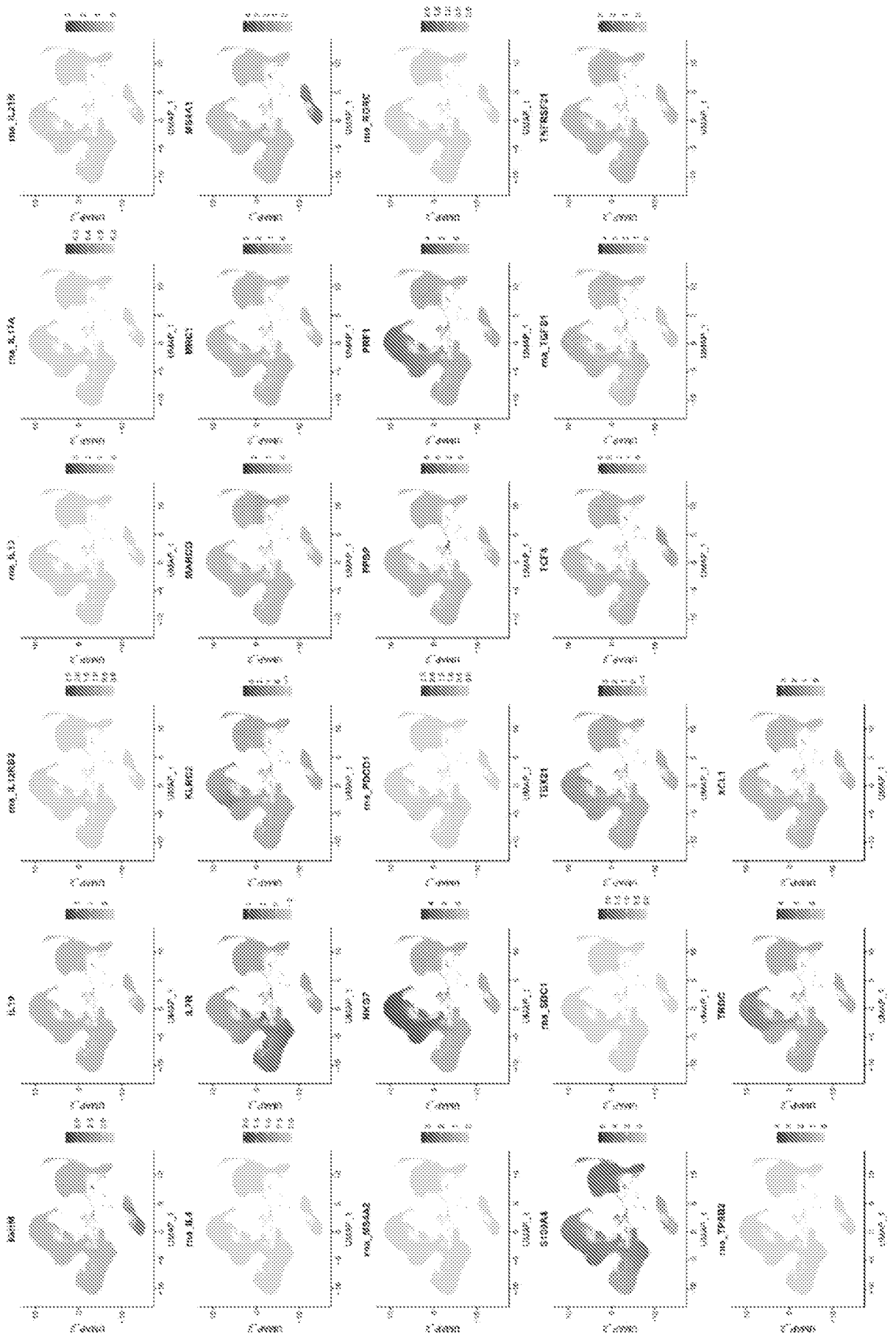


Figure 4

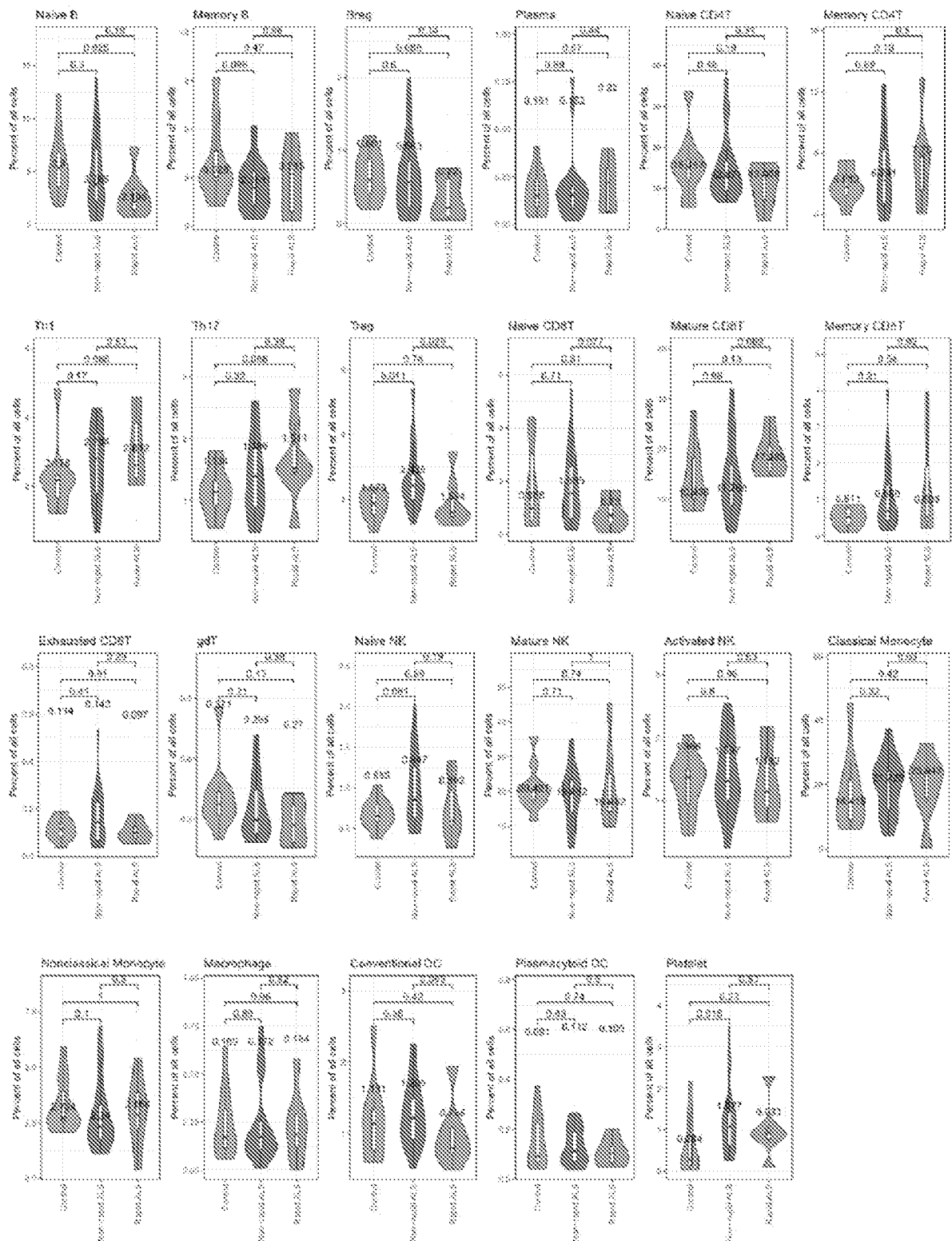
[図5-1]



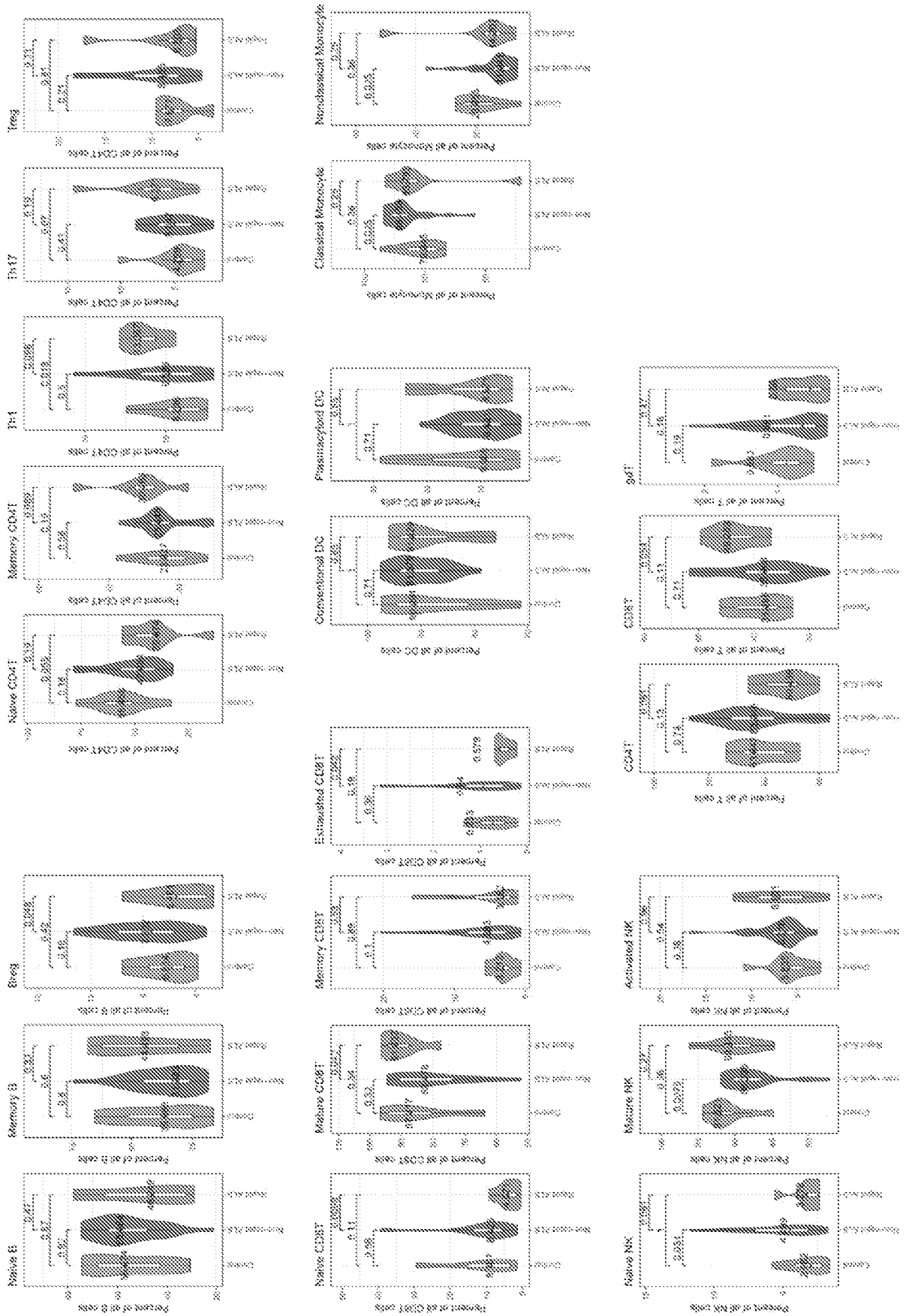
[図5-2]



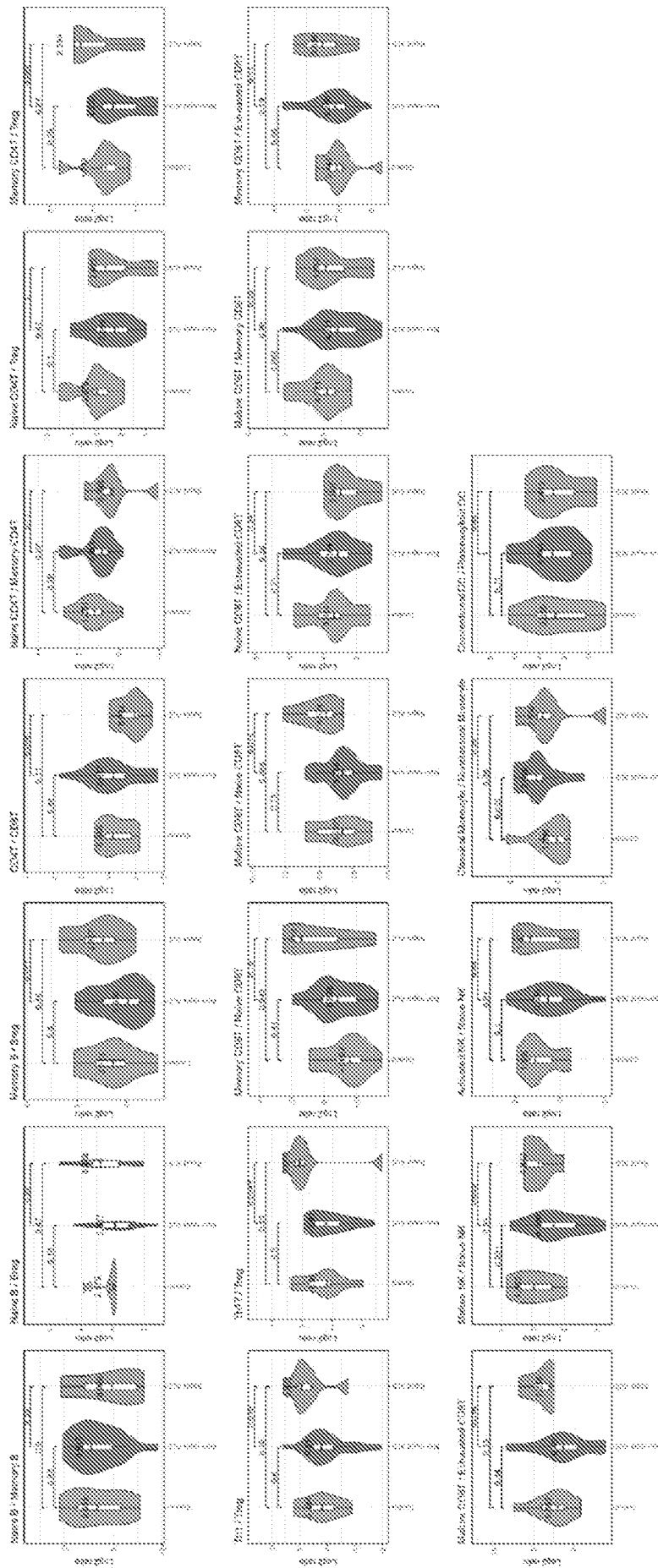
[圖6]



[7]



[8]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/032644

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 33/68</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/6869</i> (2018.01)i; <i>G01N 33/50</i> (2006.01)i FI: G01N33/68; G01N33/50 K; C12Q1/6869 Z		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/68; C12Q1/6869; G01N33/50		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JIN, Mengmeng. Interleukin-17 and Th17 lymphocytes directly impair motoneuron survival of wildtype and FUS-ALS mutant human iPSCs. International Journal of Molecular Sciences. 27 July 2021, 22, 8042, pp. 1-15, doi: 10.3390/ijms22158042 abstract, introduction, results, p. 4, 2.2., pp. 8-9, 3. Discussion	1-6
Y		1-6
X	FIALA, Milan. IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. Jpurnal of Neuroinflammation. 2010, 7, 76, pp. 1-14 abstract, p. 4, results, p. 7, discussion, pp. 11-12	1-6
Y		1-6
X	FU, Jiajia. The role of Th17 cells/Il-17A in AD, PD, ALS and the strategic therapy targeting on IL-17A. Journal of Neuroinflammation. 2022, 19, 98, pp. 1-12, doi: 10.1186/s12974-022-02446-6 abstract, background, p. 3, left column, p. 7, Th17 cells and Il-17A in ALS	1-6
Y		1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "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 <b>22 November 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>03 December 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2024/032644**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN, Junjue. Interleukin-17A: The key cytokine in neurodegenerative diseases. Front. Aging Neurosci. vol. 12, article.566922, pp. 1-13, doi: 10.3389/fnagi.2020.566922 abstract, introduction, p. 4, upper right column, p. 6, right column, p. 8, left column, p. 9, conclusion	1-6
Y		1-6
Y	JP 2013-522589 A (IEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.) 13 June 2013 (2013-06-13) claims, paragraph [0001]	1-6
Y	JP 2013-511732 A (COMMONWEALTH SCIENT AND IND RES ORGANISATION) 04 April 2013 (2013-04-04) claims, paragraph [0111]	1-6
Y	JP 2021-523375 A (THE METHODIST HOSPITAL) 02 September 2021 (2021-09-02) claims	1-6
Y	WO 2023/044331 A1 (THE METHODIST HOSPITAL) 23 March 2023 (2023-03-23) abstract, claims	1-6

**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:

Document 1 : JIN, Mengmeng. Interleukin-17 and Th17 lymphocytes directly impair motoneuron survival of wildtype and FUS-ALS mutant human iPSCs. International Journal of Molecular Sciences. 27 July 2021, 22, 8042, pp. 1-15, doi: 10.3390/ijms22158042

Document 2 : FIALA, Milan. IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. Journal of Neuroinflammation. 2010, 7, 76, pp. 1-14

Document 3 : FU, Jiajia. The role of Th17 cells/IL-17A in AD, PD, ALS and the strategic therapy targeting on IL-17A. Journal of Neuroinflammation. 2022, 19, 98, pp. 1-12, doi: 10.1186/s12974-022-02446-6

Document 4 : CHEN, Junjue. Interleukin-17A: The key cytokine in neurodegenerative diseases. Front. Aging Neurosci. vol. 12, article.566922, pp. 1-13, doi: 10.3389/fnagi.2020.566922

Document 5 : JP 2013-522589 A (IEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.)13 June 2013 (2013-06-13) claims, paragraph [0001] & US 2013/0230499 A1 & WO 2011/111043 A1 & CA2792471 A1

Document 6 : JP 2013-511732 A (COMMONWEALTH SCIENT AND IND RES ORGANISATION) 04 April 2013 (2013-04-04) claims, paragraph [0111] & US 2013/0116135 A1 & WO2011/063453 A1

Document 7 : JP 2021-523375 A (THE METHODIST HOSPITAL) 02 September 2021 (2021-09-02) claims & US 2021/0231686 A1 & WO 2019/217916 A1 & CN 112424608 A & KR 10-2021-0014109 A

Document 8 : WO 2023/044331 A1 (THE METHODIST HOSPITAL) 23 March 2023 (2023-03-23) abstract, claims & CA 3231818 A1 & KR 10-2024-0053657 A & CN 118159847 A

In claim 1, the invention-specifying matter of one claim is expressed by 16 alternatives. The common technical feature from the alternatives described in claim 1 of “a biomarker used for determining or diagnosing a progression rate or potential for contracting amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and/or for selecting or predicting a therapeutic agent” does not make a contribution over the prior art in light of the disclosures of documents 1-8, and thus cannot be said to be a special technical feature. Accordingly, the invention that includes the invention-specifying matter understood by selecting the first alternative of an “IL-17A” is classified as invention 1. The invention related to the remaining alternatives in claim 1 is classified as inventions 2-16.

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 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.: **Claims 1-6 (IL-17A)**

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/JP2024/032644</b>
---

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2013-522589	A	13 June 2013	US 2013/0230499 claims	A1
				WO 2011/111043	A1
				CA 2792471	A1
-----					
JP	2013-511732	A	04 April 2013	US 2013/0116135 claims	A1
				WO 2011/063453	A1
-----					
JP	2021-523375	A	02 September 2021	US 2021/0231686 claims	A1
				WO 2019/217916	A1
				CN 112424608	A
				KR 10-2021-0014109	A
-----					
WO	2023/044331	A1	23 March 2023	CA 3231818	A1
				KR 10-2024-0053657	A
				CN 118159847	A
-----					

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>G01N 33/68(2006.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; G01N 33/50(2006.01)i                  FI: G01N33/68; G01N33/50 K; C12Q1/6869 Z</p>																							
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>G01N33/68; C12Q1/6869; G01N33/50</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2024年</td> </tr> </table> <p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年													
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																						
日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年																						
日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年																						
日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年																						
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Mengmeng Jin, Interleukin-17 and Th17 lymphocytes directly impair motoneuron survival of wildtype and FUS-ALS mutant human iPSCs, International Journal of Molecular Sciences, 2021.07.27, 22, 8042, p1-15, doi: 10.3390/ijms22158042 abstract, introduction, results, p4 2.2., p8-9 3.Discussion</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Milan Fiala, IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients, Jpurnal of Neuroinflammation, 2010, 7, 76, p1-14 abstract, p4 resultts, p7 discussion, p11-12</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Jiajia Fu, The role of Th17 cells/Il-17A in AD, PD, ALS and the strategic therapy targeting on IL-17A, Journal of Neuroinflammation, 2022, 19, 98, p1-12, doi: 10.1186/s12974-022-02446-6 abstract, background, p3左欄, p7 Th17 cells and Il-17A in ALS</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table>			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	Mengmeng Jin, Interleukin-17 and Th17 lymphocytes directly impair motoneuron survival of wildtype and FUS-ALS mutant human iPSCs, International Journal of Molecular Sciences, 2021.07.27, 22, 8042, p1-15, doi: 10.3390/ijms22158042 abstract, introduction, results, p4 2.2., p8-9 3.Discussion	1-6	Y		1-6	X	Milan Fiala, IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients, Jpurnal of Neuroinflammation, 2010, 7, 76, p1-14 abstract, p4 resultts, p7 discussion, p11-12	1-6	Y		1-6	X	Jiajia Fu, The role of Th17 cells/Il-17A in AD, PD, ALS and the strategic therapy targeting on IL-17A, Journal of Neuroinflammation, 2022, 19, 98, p1-12, doi: 10.1186/s12974-022-02446-6 abstract, background, p3左欄, p7 Th17 cells and Il-17A in ALS	1-6	Y		1-6
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	Mengmeng Jin, Interleukin-17 and Th17 lymphocytes directly impair motoneuron survival of wildtype and FUS-ALS mutant human iPSCs, International Journal of Molecular Sciences, 2021.07.27, 22, 8042, p1-15, doi: 10.3390/ijms22158042 abstract, introduction, results, p4 2.2., p8-9 3.Discussion	1-6																					
Y		1-6																					
X	Milan Fiala, IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients, Jpurnal of Neuroinflammation, 2010, 7, 76, p1-14 abstract, p4 resultts, p7 discussion, p11-12	1-6																					
Y		1-6																					
X	Jiajia Fu, The role of Th17 cells/Il-17A in AD, PD, ALS and the strategic therapy targeting on IL-17A, Journal of Neuroinflammation, 2022, 19, 98, p1-12, doi: 10.1186/s12974-022-02446-6 abstract, background, p3左欄, p7 Th17 cells and Il-17A in ALS	1-6																					
Y		1-6																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																							
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの</p> <p>“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献</p> <p>“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</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>																							
<p>国際調査を完了した日</p> <p>22. 11. 2024</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>03. 12. 2024</p>																						
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>中村 直子 2J 4406</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3252</p>																						

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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	Junjue Chen, Interleukin-17A: The key cytokine in neurodegenerative diseases, Front. Aging Neurosci., vol.12, article.566922, pl-13, doi: 10.3389/fnagi.2020.566922 abstract, introduction, p4右上欄, p6右欄, p8左欄, p9 conclusion	1-6
Y		1-6
Y	JP 2013-522589 A (イエダ リサーチ アンド デイベロップメント カンパニー リミテッド) 13.06.2013 (2013 - 06 - 13) 特許請求の範囲, [0001]	1-6
Y	JP 2013-511732 A (コモンウェルス サイエнтиフィック アンド インダストリアル リサーチ オーガニゼーション) 04.04.2013 (2013 - 04 - 04) 特許請求の範囲, [0111]	1-6
Y	JP 2021-523375 A (ザ・メソジスト・ホスピタル) 02.09.2021 (2021 - 09 - 02) 特許請求の範囲	1-6
Y	WO 2023/044331 A1 (THE METHODIST HOSPITAL) 23.03.2023 (2023 - 03 - 23) abstract, claims	1-6

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

文献1：Mengmeng Jin, Interleukin-17 and Th17 lymphocytes directly impair motoneuron survival of wildtype and FUS-ALS mutant human iPSCs, International Journal of Molecular Sciences, 2021.07.27, 22, 8042, pl-15, doi: 10.3390/ijms22158042

文献2：Milan Fiala, IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients, Jpurnal of Neuroinflammation, 2010, 7, 76, pl-14

文献3：Jiajia Fu, The role of Th17 cells/IL-17A in AD, PD, ALS and the strategic therapy targeting on IL-17A, Journal of Neuroinflammation, 2022, 19, 98, pl-12, doi: 10.1186/s12974-022-02446-6

文献4：Junjue Chen, Interleukin-17A: The key cytokine in neurodegenerative diseases, Front. Aging Neurosci., vol.12, article.566922, pl-13, doi: 10.3389/fnagi.2020.566922

文献5：JP 2013-522589 A (イエダ リサーチ アンド デイベロップメント カンパニー リミテッド) 13.06.2013(2013-06-13) 特許請求の範囲, [0001] & US 2013/0230499 A1 & WO 2011/111043 A1 & CA2792471 A1

文献6：JP 2013-511732 A (コモンウェルス サイエントフィック アンド インダストリアル リサーチ オーガニゼーション) 04.04.2013(2013-04-04) 特許請求の範囲, [0111] & US 2013/0116135 A1 & WO2011/063453 A1

文献7：JP 2021-523375 A (ザ・メソジスト・ホスピタル) 02.09.2021(2021-09-02) 特許請求の範囲 & US 2021/0231686 A1 & WO 2019/217916 A1 & CN 112424608 A & KR 10-2021-0014109 A

文献8：WO 2023/044331 A1 (THE METHODIST HOSPITAL) 23.03.2023(2023-03-23) abstract, claims & CA 3231818 A1 & KR 10-2024-0053657 A & CN 118159847 A

請求項1は、一の請求項において発明特定事項が16個の選択肢で表現されている。請求項1に記載の選択肢における共通の技術的特徴である「筋萎縮性側索硬化症（ALS）の、進行速度または罹患の可能性を決定または診断することにおける、および/または治療薬を選択または予測することにおける、使用のためのバイオマーカー」は、文献1-8の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。そして、最初の選択肢である「IL-17A」を選んで把握される発明特定事項を含む発明を発明1に区分する。請求項1の残りの選択肢に係る発明を発明2-16に区分する。

- 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
- 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
- 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
- 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。請求項1-6（IL-17A）

- 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
  - 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
  - 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/032644

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2013-522589	A	13.06.2013	US	2013/0230499	A1	
				Claims			
				WO	2011/111043	A1	
				CA	2792471	A1	
-----							
JP	2013-511732	A	04.04.2013	US	2013/0116135	A1	
				claims			
				WO	2011/063453	A1	
-----							
JP	2021-523375	A	02.09.2021	US	2021/0231686	A1	
				claims			
				WO	2019/217916	A1	
				CN	112424608	A	
				KR	10-2021-0014109	A	
-----							
WO	2023/044331	A1	23.03.2023	CA	3231818	A1	
				KR	10-2024-0053657	A	
				CN	118159847	A	
-----							