

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-533079

(P2012-533079A)

(43) 公表日 平成24年12月20日(2012.12.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-520111 (P2012-520111)	(71) 出願人	591100596
(86) (22) 出願日	平成21年7月16日 (2009.7.16)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
(85) 翻訳文提出日	平成24年2月17日 (2012.2.17)		サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2009/054212		ディカル
(87) 国際公開番号	W02011/007209		フランス国 7 5 6 5 4 パリ セデックス
(87) 国際公開日	平成23年1月20日 (2011.1.20)		ス 1 3 リュ ドゥ トルビアック 1 0
			1
		(71) 出願人	596096180
			ユニベルシテ・クロード・ベルナール・リ
			ヨン・ブルミエ
			フランス, エフ-6 9 6 2 2 ヴィユール
			バンヌ セデックス, ブルヴァール ドゥ
			1 1 ノヴァンブル 1 9 1 8, 4 3
		(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中枢神経系の炎症疾病の血液マーカーとしての切断およびリン酸化されたCRMP 2

(57) 【要約】

本発明は、被験体における中枢神経系の炎症疾病のin vitroにおける予知、診断および／またはモニタリングのための方法に関し、前記方法は、被験体からの免疫系細胞の試料中における、チロシン479 (Y 4 7 9) 上でリン酸化された、場合によりセリン465 (S 4 6 5) 上でさらにリン酸化された、コラプシン応答媒介タンパク質2 (CRMP 2) の存在を検出することを含み、場合によりセリン465上でさらにリン酸化された、Y 4 7 9のリン酸化されたCRMP 2の存在の検出は、中枢神経系の炎症疾病を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における中枢神経系の炎症疾病の *in vitro* における予知、診断および／またはモニタリングのための方法であって、前記方法は、被験体からの免疫系細胞の試料中における、チロシン 479 (Y 479) 上でリン酸化されたコラプシン応答媒介タンパク質 2 (CRMP 2) の存在を検出することを含み、Y 479 のリン酸化された CRMP 2 の存在の検出は、中枢神経系の炎症疾病を示す、前記方法。

【請求項 2】

前記の Y 479 のリン酸化された CRMP 2 が切断型である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記の Y 479 のリン酸化された CRMP 2 が、セリン 465 (S 465) 上でさらにリン酸化されている、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記の Y 479 のリン酸化された CRMP 2 が、Y 479 のリン酸化された CRMP 2 に特異的な抗体を用いて検出される、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

前記の中枢神経系の炎症疾病が、髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脳脊髄炎、脳炎 (encephalitis) または脊髄症、多発性硬化症、パーキンソン病およびアルツハイマー病を伴うウイルス感染または細菌感染からなる群より選択される、請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

チロシン 479 上でリン酸化された CRMP 2 に特異的な抗体。

【請求項 7】

セリン 465 上でリン酸化された CRMP 2 に特異的な抗体。

【請求項 8】

中枢神経系の炎症疾病の予知、診断および／またはモニタリングにおいて使用するための請求項 6 または 7 記載の抗体。

【請求項 9】

免疫細胞の遊走を減少させるために使用するための請求項 6 または 7 記載の抗体。

【請求項 10】

中枢神経系の炎症疾病の処置において使用するための請求項 6 または 7 記載の抗体。

【請求項 11】

前記の中枢神経系の炎症疾病が、髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脳脊髄炎、脳炎 (encephalitis) または脊髄症、多発性硬化症、パーキンソン病およびアルツハイマー病を伴うウイルス感染または細菌感染からなる群より選択される、請求項 10 記載の使用のための抗体。

【請求項 12】

チロシン 479 および／またはセリン 465 上でリン酸化された CRMP 2 を検出するための請求項 6 または 7 において定義したような抗体の使用。

【請求項 13】

さらに切断型である CRMP 2 を検出するための、請求項 12 記載の使用。

【請求項 14】

免疫細胞の遊走を減少させるために使用するための CXCR4 レセプターのアンタゴニスト。

【請求項 15】

中枢神経系の炎症疾病の処置において使用するための、請求項 14 記載の使用のためのアンタゴニスト。

【請求項 16】

前記の中枢神経系の炎症疾病が、髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脳脊髄炎、脳炎 (encephalitis) または脊髄症、多発性硬化症、パーキンソン病およびアルツハイマー病を伴うウイ

10

20

30

40

50

ルス感染または細菌感染からなる群より選択される、請求項15記載の使用のためのアンタゴニスト。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、中枢神経系の炎症疾病を予測、診断および／または処置するための方法に関する。

【0002】

発明の背景

神経炎症疾病、すなわち中枢神経系の炎症疾病は、炎症、および通常は脱髄、および軸索損傷に関連した急激な神経障害によって特徴付けられる。これらの疾患では、神経炎症が、脳および脊髄における神経細胞線維を絶縁する髄鞘を損傷し、それが下にある神経に対して広範でしばしば永久的な損傷を引き起こす。神経炎症疾病を患う患者には、感覚機能および運動機能の劇的で時に永久的な低下が起こる。神経炎症疾病に関連した有病率、罹患率および死亡率に因り、それらはかなりの医学的、社会的および経済的重荷を課す。北米においてはこれらの神経学的状態に500万人を超える人が罹患し、そして年間750億米ドルを超える治療費が発生すると推定されている。

【0003】

神経炎症疾病は診断および処置が困難である。残念なことに、不正確な診断により患者に不確実性が生じる。従って、神経炎症症状を寛解しそして神経学的機能を保存するための適切な処置法が確実に実行されるために、神経炎症疾病を診断するための迅速かつ正確な方法が重要である。従って、中枢神経系の炎症疾病を予測、診断および／または処置するための新たな方法が必要とされる。

【0004】

本発明者らは、国際出願WO2003/022298において、免疫系の機能障害に関連した病態の処置、予知または診断のためのコラプシン応答媒介タンパク質2 (CRMP2) の可能性ある使用を示した。より具体的には、本発明者らは、CRMP2が、異常免疫病態を患う患者のTリンパ球において高いレベルで存在し、そして高度にリン酸化された型のCRMP2の核移行が、HTLV-1に感染したリンパ球、またはFas/Fasリガンド系に関連した免疫不全を有する患者のTリンパ球において増加したことを示した。

【0005】

CRMPは、中枢神経系(CNS)の軸索成長中の細胞骨格再配列のモデュレーターであることが知られている5つのメンバーのファミリーである。Tリンパ球およびCNSにおいては、CRMP2は、62kDaの完全長型(CRMP2-62)および58kDaの切断型(CRMP2-58)の両方を提示する。4つのリン酸化型のCRMP2がこれまでに記載されている：セリン522上でリン酸化されたCRMP2 (pCRMP2-Ser522)、トレオニン509および514上でリン酸化されたCRMP2 (pCRMP2-Thr509/514)、トレオニン555上でリン酸化されたCRMP2 (pCRMP2-Thr555) およびセリン465上でリン酸化されたCRMP2 (Uchida et al. (2005) Genes Cells 10:165-179; Cole et al. (2006) J Biol Chem 281:16581-16588)。

【0006】

本発明者らは、CRMP2の新たなリン酸化部位を同定した：チロシン479 (Y479)。本発明者らは、Y479のリン酸化が、CXCL12ケモカインによるTリンパ球の膜CXCR4レセプターの活性化によって誘導され (Varrin-Doyer et al. (2009) J Biol Chem 284:13265-13276)、一方、S465のリン酸化はT細胞レセプター (TCR) の刺激後に誘導されたことを実証した。

【0007】

10

20

30

40

50

発明の要約

本発明は、(i) Y 4 7 9 の突然変異が、T 細胞極性化および T 細胞遊走速度を含む T 細胞遊走能を減少させ、これは、神経炎症過程における Y 4 7 9 のリン酸化された C R M P 2 の重要性を示し、そして (i i) H T L V - 1 によって誘発される多発性硬化症または脊髄症を患う患者が、高いレベルの S e r 4 6 5 のリン酸化され切断された C R M P 2 を有する活性化 T 細胞個体群を提示したという本発明者らによる意外な所見からもたらされる。これらのリン酸化および切断は、患者の免疫細胞におけるウェスタンブロットまたはフローサイトメトリーによって容易に検出できるという利点を有する。

【0008】

従って、本発明は、被験体における中枢神経系の炎症疾病の *in vitro* における予知、診断および／またはモニタリングのための方法に関し、前記方法は、被験体からの免疫系細胞の試料中における、チロシン 4 7 9 (Y 4 7 9) 上でリン酸化されたコラプシン応答媒介タンパク質 2 (C R M P 2) の存在を検出することを含み、Y 4 7 9 のリン酸化された C R M P 2 の存在の検出は、中枢神経系の炎症疾病を示す。

【0009】

本発明はまた、チロシン 4 7 9 上でリン酸化された C R M P 2 に特異的な抗体、および中枢神経系の炎症疾病の予知、診断および／またはモニタリングにおけるその使用、免疫細胞の遊走を減少させるためのその使用、および中枢神経系の炎症疾病の処置におけるその使用に関する。

【0010】

本発明はまた、チロシン 4 7 9 および／またはセリン 4 6 5 上でリン酸化された C R M P 2 を検出するための前記において定義したような抗体に関する。

【0011】

本発明はまた、T リンパ球の遊走を減少させるために使用するための C X C R 4 レセプターのアンタゴニスト、および中枢神経系の炎症疾病の処置における使用に関する。

【0012】

発明の詳細な説明

中枢神経系の炎症疾病

本明細書において使用する「中枢神経系の炎症疾病」または「神経炎症疾病」は、炎症、脱髄、あるいは軸索および／または神経の損傷に関連した、中枢神経系の疾病を示す。中枢神経系 (C N S) の炎症疾病は、非感染性または感染性であり得る。炎症病変を引き起こし得る非感染性疾患としては、いくつかの毒素、自己免疫疾患および免疫介在性状態が挙げられる。ウイルス、細菌、真菌、原虫および後生動物寄生虫は全て、C N S の炎症疾病を引き起こし得る。C N S の炎症疾病は特に、W H O によって刊行されている疾病および関連保険問題の国際統計分類 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) のコード G 0 0 から G 0 9 に集められている。C N S の炎症疾病の例としては、髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脊髄症または脳脊髄炎；頭蓋内および髄腔内の膿瘍および肉芽腫；頭蓋内および髄腔内の静脈炎および血栓性静脈炎；多発性硬化症；アルツハイマー病およびパーキンソン病を伴うウイルス感染、細菌感染または寄生虫感染が挙げられる。好ましくは、本発明による C N S の炎症疾病は、髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脳脊髄炎、脳炎 (encephalitis) または脊髄症、多発性硬化症、パーキンソン病およびアルツハイマー病を伴うウイルス感染または細菌感染からなる群より選択される。より好ましくは、本発明による C N S の炎症疾病は、脳炎、多発性硬化症、アルツハイマー病およびパーキンソン病を伴うウイルス感染からなる群より選択される。

【0013】

本明細書において使用する「髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脊髄症または脳脊髄炎を伴うウイルス感染」としては、レトロウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、風疹ウイルス、天然痘ウイルス、水痘、水痘帯状疱疹ウイルス、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、ポリオウイルス、H T L V - 1 およびエプシュタン・バーウイルスに因るウイルス感染が挙げられる。好ま

しくは、本発明によるウイルス感染は、H T L V - 1 またはH I V に因るウイルス感染からなる群より選択される。

【0014】

本明細書において使用する「髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脊髄症または脳脊髄炎を伴う細菌感染」としては、*Haemophilis influenzae*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus agalactiae*、*Staphylococcus aureus*、*Neisseria meningitidis*、*Escherichia coli*、*Klebsiella*、*Friedlander bacillus*、*Bacillus anthracis*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Leptospira*、*Listeria monocytogenes*、*Borrelia*、*Treponema pallidum*、*Salmonella*、*Mycobacterium tuberculosis*および*Salmonella enterica*に因る細菌感染が挙げられる。

10

【0015】

本明細書において使用する「髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脊髄症または脳脊髄炎を伴う寄生虫感染」としては、*Trypanosoma*、特に*Trypanosoma brucei*および*Trypanosoma cruzi*、*Toxoplasma gondii*および*Naegleria fowleri*に因る寄生虫感染が挙げられる。

【0016】

C R M P 2

本明細書において使用する「コラブシン応答媒介タンパク質2」または「C R M P 2」または「U L I P 2」は、神経成長円錐の発育 (Goshima et al. (1995) *Nature* 376:509-514; Charrier et al. (2003) *Mol. Neurobiol.* 28:51-64) および微小管組織を介した神経細胞の遊走において初めて記載されたリン酸化タンパク質を指す。それは、細胞質リン酸化タンパク質のC R M P / T O A D / U l i p / D R P ファミリーのメンバーである。好ましくは、C R M P 2 は、配列番号1のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

20

【0017】

本発明の脈絡において、本発明者らは、C R M P 2 が、チロシン479 (Y479) 上でリン酸化され得ることを実証した。さらに、Y479のリン酸化されたC R M P 2 は、完全長型または切断型のいずれかであり得る。Y479のリン酸化されたC R M P 2 の完全長型は、完全長型の62kDaのC R M P 2 (C R M P 2 - 62) に対応するが、切断型は、切断型の58kDaのC R M P 2 (C R M P 2 - 58) に対応する。より特定すると、C R M P 2 - 58 は、C R M P 2 のアミノ酸489から532の間に位置するRogemon et al. に記載の切断部位におけるC R M P 2 - 62 の切断によって得られる (Rogemon et al. (2008) *J. Biol. Chem* 283:14751-14761)。C R M P 2 およびY479のリン酸化されたC R M P 2、特にその切断型のそれは、セリン465 (S465) 上でさらにリン酸化され得る。

30

【0018】

抗体およびその使用

本発明は、チロシン479上でリン酸化されたC R M P 2 に特異的な抗体に関する。

【0019】

本明細書において使用する「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子およびこれらの免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を指す。従って、「抗体」という用語は、完全な抗体分子だけではなく、抗体フラグメント並びに抗体の変異体 (誘導体も含む) および抗体フラグメントの変異体も含む。本発明による抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。

40

【0020】

本明細書において使用する「モノクローナル抗体」は、特異的な抗原に対して作られ、そして例えばB細胞またはハイブリドーマの単一のクローンによって組換えまたは産生され得る、単一のアミノ酸組成の抗体を指す。

【0021】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部、好ましくはインタクトな抗体の可変領域または抗原結合領域を含む。適切な抗体フラグメントの例としては、F v、F a b

50

、Fab'、(Fab')₂、Fd、dAb、scFv、dsFv、sc(Fv)₂フラグメントおよびディアボディが挙げられる。本発明による抗体はまたラクダ科ナノボディであり得る。本発明による抗体は、改変された抗体であり得る。特に、本発明による抗体は、マーカー部分にコンジュゲーションされ得る。マーカー部分は、例えば、非放射性マーカー部分、例えばフルオロフォア、補酵素、例えばビオチン、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、色素、ポリエチレングリコールなどであり得る。

【0022】

「特異的」という用語は、ターゲットへのリガンドの認識または結合を言及する場合、前記リガンドが、ターゲットとの構造的類似性を全く示さない別のターゲットと実質的に相互作用することなく、ターゲットと相互作用することを意味する。特に、前記に定義したようなY479のリン酸化されたCRMP2に特異的な抗体は、CRMP2がチロシン残基479上にリン酸基を有する場合にはCRMP2を特異的に認識し結合するが、CRMP2がチロシン残基479上にリン酸基を有さない場合にはそうではない。好ましくは、前記に定義したようなY479のリン酸化されたCRMP2に特異的な抗体はまた、CRMP2がセリン465上にリン酸基をさらに有する場合にもCRMP2を認識し結合する。

10

【0023】

本発明はまた、セリン465上でリン酸化されたCRMP2（S465のリン酸化されたCRMP2）に特異的な抗体に関する。特に、前記に定義したようなS465のリン酸化されたCRMP2に特異的な前記抗体は、CRMP2がセリン残基465上にリン酸基を有する場合にはCRMP2を特異的に認識し結合するが、CRMP2がチロシン残基465上にリン酸基を有さない場合にはそうではない。好ましくは、前記に定義したようなS465のリン酸化されたCRMP2に特異的な抗体はまた、CRMP2がチロシン479上にリン酸基をさらに有する場合にもCRMP2を認識し結合する。

20

【0024】

前記に定義したような抗体は、完全長および／または切断されリン酸化されたCRMP2を認識し結合する。好ましくは、前記に定義したようなS465のリン酸化されたCRMP2に特異的な抗体は、切断されたS465のリン酸化されたCRMP2を認識し結合する。

【0025】

対象の抗原と特異的に反応するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生するための方法は当業者に公知である（例えば、Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; Harlow and Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (eds.); Basic and Clinical Immunology (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2^d ed.) Academic Press, New York, NY;および Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497参照）。

30

【0026】

所望の特異性を有する本発明による抗体を含む抗血清を産生するために、リン酸化されたCRMP2を使用して、適切な動物、例えばマウス、ウサギ、または霊長類を免疫化し得る。標準的なアジュバント、例えばフロイントアジュバントを標準的な免疫化プロトコールに従って使用することができる、試験血を採取し、そして対象の抗原に対する反応性の力価を決定することによって、免疫原調製物に対する動物の免疫応答をモニタリングし得る。抗原に対して特異的に反応性である抗体を濃縮するための抗血清のさらなる分画および抗体の精製を、続いて、当業者に周知の方法を使用して達成することができる。

40

【0027】

モノクローナル抗体を、当業者によく知られた種々の技術を使用して得ることができる。典型的には、所望の抗原で免疫化された動物からの脾臓細胞を、一般的には骨髓腫細胞との融合によって不死化する（Kohler and Milstein (1976) Eur. J. Immunol. 6:511-519）。不死化の代替的な方法としては、エプシュタイン・バーウイルス、発癌遺伝子もし

50

くはレトロウイルスを用いての形質転換、または当技術分野において周知の他の方法が挙げられる。単一の不死化細胞から生じるコロニーを、抗原に対する所望の特異性および親和性を有する抗体の産生のためにスクリーニングし、そしてこのような細胞によって産生されるモノクローナル抗体の収量は、脊椎動物宿主の腹腔への注射を含む種々の技術によって増強され得る。さらに、Huse et al.(1989) Science 246:1275-1281によって概略が示された一般的なプロトコールに従ってヒトB細胞cDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、所望の特異性を有する抗体またはこのような抗体の結合フラグメントをコードする核酸配列が同定されると、モノクローナル抗体はまた組換え産生され得る。モノクローナル抗体はまた、組換えDNA法を使用して（例えば米国特許第4,816,567号参照）またはファージディスプレイによって産生され得る。「ファージディスプレイ」という用語は、本明細書において、バクテリオファージカプシド上に発現されそしてカプシドをコードする遺伝子に挿入された核酸配列によってコードされた、リガンドを選択するための方法を指す。この方法は、当業者には周知であり、そして特にScott and Smith (1990) Science 249:386-390、およびMarks et al. (1991) J. Mol. Biol.222:581-597によって記載されている。

【0028】

特定の態様において、前記に定義した抗体はヒト化モノクローナル抗体である。「ヒト化抗体」は、ヒト抗体とより密接に一致する（アミノ酸配列において）ように改変された非ヒト抗体を指す。特定の態様において、非ヒト抗体の可変領域の抗原結合残基の外のアミノ酸残基が改変される。大部分について、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域からの残基によって置換されている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。特定の態様において、ヒト化抗体は、ヒト抗体のCDRの全部または一部を、所望の抗原結合特異性を有する非ヒト抗体などの別の抗体からのCDRの全部または一部で置換することによって構築される。特定の態様において、ヒト化抗体は、CDRの全部または実質的に全部が非ヒト抗体のCDRに対応し、そしてフレームワーク領域（FR）の全部または実質的に全部がヒト抗体のFRに対応する、可変領域を含む。特定のこのような態様において、ヒト化抗体はさらに、ヒト抗体の定常領域（Fc）を含む。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見られない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに洗練させるために行なわれる。さらなる詳細については、Jones et al. (1986) Nature321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-329;およびPresta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596を参照されたい。ヒト化抗体の使用は、マウス定常領域の免疫原性に関連した潜在的な問題を取り除く。

【0029】

本発明に従って使用する前に、本発明による抗体を精製し得る。抗体精製のための方法は生物医学研究の分野において周知であり、それには精製しようとする抗体の独特な特徴に依拠するものもあり、また、幅広い適用に適した標準的なタンパク質分離技術であるものもある。

【0030】

塩析を最初の工程として使用して、他の望ましくないタンパク質から所望の抗体を分離することができる。好ましい塩は硫酸アンモニウムであり、これはタンパク質混合物中の水の量を効果的に減少させることによってタンパク質を沈降させる。その後、タンパク質は、その溶解度に基づいて沈降する。タンパク質がより疎水性であればある程、より低い硫酸アンモニウム濃度で沈降する可能性が高くなる。典型的なプロトコールは生じる硫酸アンモニウム濃度が20～30%となるように、タンパク質溶液に飽和硫酸アンモニウムを加えるものである。これは大半の疎水性タンパク質を沈降させる。所望の抗体を、その疎水性により適切な硫酸アンモニウム濃度で沈降させ、そしてその後、必要であれば透析またはダイアフィльтраーションのいずれかを通して過剰な塩を除去しながら緩衝液中で可溶化する。タンパク質の溶解度に依拠する他の方法、例えば冷エタノール沈降法は当業

者に周知であり、そしてこれを使用して、血清などのタンパク質混合物から抗体画分を調製し得る。

【0031】

予測される分子量に基づいて、抗体を、種々の孔径のメンブレン（例えばAmiconまたはMilliporeメンブレン）を通した限外濾過を使用してより大きなおよびより小さなサイズのタンパク質から単離することができる。第一工程として、タンパク質混合物（例えば血清または細胞培養上清）を、所望の抗体の予測される分子量よりも小さな分子量カットオフを有する孔径を有するメンブレンを通して限外濾過する。その後、限外濾過の残余分を、所望の抗体の予測される分子量よりも大きな分子量カットオフを有するメンブレンに対して限外濾過する。抗体はメンブレンを通して濾液中へと入り、これをその後、次の工程のカラムクロマトグラフィーで処理することができる。

10

【0032】

本発明による抗体はまた、そのサイズ、正味の表面荷電、疎水性およびリガンドに対する親和性に基づいて、他の抗体を含む他のタンパク質から分離することができる。カラムクロマトグラフィーは頻繁に使用される方法である。例えば、抗体を、抗体のFc領域中のドメインに結合する細菌細胞壁タンパク質である、プロテインAまたはプロテインGの固定されたカラムを使用して他の非抗体タンパク質から単離することができる。さらに、異なる抗原に対する抗体を、抗体精製のための好ましい形式のカラムクロマトグラフィーのカラムに固定された、これらの抗原に対するその明確に異なる親和性に基づいて分離することができる。これらの全ての方法は当技術分野において周知であり、そしてクロマトグラフィー技術を、任意の規模で、そして多くの異なる製造業者（例えばPharmacia Biotech）からの装置を使用して実施することができることは当業者には明らかであろう。

20

【0033】

本発明はまた、チロシン479上で、場合によりさらにセリン465上でリン酸化されたCRMP2を検出するための前記に定義したような抗体の使用に関する。前記検出は、抗体の結合を可視化することを可能とする適切な免疫検出技術を使用して実施され得る。このような検出技術は当業者には周知であり、そしてこれには免疫組織細胞化学、免疫蛍光、免疫沈降、ウェスタンイムノブロット、化学発光、比色技術および放射標識技術が挙げられる。

【0034】

好ましい態様において、本発明による抗体の使用は、さらに切断型であるCRMP2を検出するためである。

30

【0035】

in vitroにおける予知、診断および／またはモニタリングのための方法

本発明は、被験体における中枢神経系の炎症疾病のin vitroにおける予知、診断および／またはモニタリングのための方法に関し、前記方法は、被験体からの免疫系細胞の試料中における、Y479のリン酸化されたCRMP2の存在を検出することを含み、Y479のリン酸化されたCRMP2の存在の検出は中枢神経系の炎症疾病を示す。

【0036】

本発明はまた、被験体における中枢神経系の炎症疾病を検出するためのin vitroにおける方法を記載し、前記方法は、被験体から採取した免疫系細胞の試料中における、Y479のリン酸化されたCRMP2の存在をin vitroにおいて検出することを含み、Y479のリン酸化されたCRMP2の存在の検出は中枢神経系の炎症疾病を示す。

40

【0037】

本明細書において使用する「診断法」または「診断」は、被験体が病態を患っているかどうかを決定するための方法を指す。

【0038】

本明細書において使用する「予知法」または「予知」は、被験体が病態を発症する可能性があるかどうかを決定するための方法を指す。

【0039】

50

本明細書において使用する「モニタリング法」は、被験体における病態の発展を決定するための方法を指す。

【0040】

本明細書において使用する「免疫系細胞」は、自然免疫反応および適応免疫反応の細胞、特にTリンパ球およびBリンパ球、樹状細胞、単球およびナチュラルキラー細胞を包含する。

【0041】

本明細書において使用する「試料」は、より大きなセットの一部を指す。好ましくは、本発明による免疫系細胞の試料は、被験体の血液または脳から採取し、および／または特に血液細胞の亜個体群などを含む。好ましくは、本発明による免疫系細胞の試料は、Tリンパ球を含むまたはそれからなる。

10

【0042】

特定の態様において、前記に定義した方法において、前記のY479のリン酸化されたCRMP2は完全長型である。別の特定の態様において、前記の定義した方法において、前記のY479のリン酸化されたCRMP2は切断型である。これらの態様において、前記のY479のリン酸化されたCRMP2はセリン465上でさらにリン酸化され得る。好ましくは、Y479のリン酸化されたCRMP2が切断型である場合、それはセリン465上でさらにリン酸化される。さらに、CRMP2は、セリン522、トレオニン509、トレオニン514および／またはトレオニン555などの他のリン酸化部位上でさらにリン酸化され得る。

20

【0043】

本発明の脈絡において、被験体の免疫系細胞の試料中におけるY479のリン酸化されたCRMP2の存在の検出は、タンパク質の存在を可視化することを可能とする任意の適切な技術によって行なわれ得る。特に、CRMP2に対して、より好ましくはY479のリン酸化されたCRMP2に対してまたはS465／Y479のリン酸化されたCRMP2に対して特異的な親和性を提示する化合物を使用して実施することができる。このような適切な化合物としては、特に抗体およびアプタマーが挙げられる。好ましくは、Y479のリン酸化されたCRMP2は、抗体、好ましくは、前記に定義したようなY479のリン酸化されたCRMP2に特異的な抗体を用いて検出される。従って、前記タンパク質の存在を可視化することを可能とする適切な技術は、抗体の結合を可視化することを可能とする任意の免疫検出技術を包含する。このような検出技術は当業者には周知であり、そしてこれには免疫組織細胞化学、免疫蛍光、免疫沈降、ウェスタンブロット、化学発光、比色技術および放射標識技術が挙げられる。

30

【0044】

本明細書において使用する「被験体」は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えばげっ歯類（マウス、ラット）、ネコ、イヌまたは霊長類）を指す。好ましくは、被験体はヒトである。

【0045】

本発明はまた、中枢神経系の炎症疾病の予知、診断および／またはモニタリングにおいて使用するための前記に定義したような抗体に関する。

40

【0046】

処置法

本発明はまた免疫細胞の遊走を減少させるために使用するための前記に定義したような抗体に関する。特に、本発明は、免疫細胞の遊走を減少させるために使用するためのチロシン479上でリン酸化されたCRMP2に特異的な抗体に関する。

【0047】

本明細書において使用する「免疫細胞」は、自然免疫反応および適応免疫反応の細胞、特にTリンパ球およびBリンパ球、樹状細胞、単球およびナチュラルキラー細胞を包含する。好ましくは、本発明による免疫細胞はTリンパ球である。

【0048】

50

本発明の脈絡において、「免疫細胞の遊走」は、リンパ器官からエフェクター部位への免疫細胞の移動を指す。本明細書において使用する「免疫細胞の遊走を減少させること」は、免疫細胞の遊走速度を遅延させること、リンパ器官からエフェクター部位へと遊走する免疫細胞の数を減少させること、またはエフェクター部位への免疫細胞の遊走を阻害することを意味する。好ましくは、本発明の脈絡において、エフェクター部位は脳である。

【0049】

本発明はまた、前記に定義したような中枢神経系の炎症疾病の処置において使用するための前記に定義したような抗体に関する。

【0050】

本発明はまた、治療有効量の前記に定義したような抗体をそれを必要とする被験体に投与することを含む、中枢神経系の炎症疾病の処置法に関する。

【0051】

本明細書において使用する「処置すること」または「処置」という用語は、このような用語を適用する疾患もしくは状態、またはこのような疾患もしくは状態の1つ以上の症状を逆行、軽減、その進行を阻害、または予防することを意味する。

【0052】

本発明によると、「被験体」または「それを必要とする被験体」という用語は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えばげっ歯類（マウス、ラット）、ネコ、イヌまたは霊長類）を意図する。

【0053】

「治療有効量」という用語は、任意の医学的処置に適用可能な妥当なベネフィット／リスク比で、前記疾病を処置するために十分な抗体の量を意味する。しかしながら、本発明の抗体の1日の総使用量は、妥当な医学的判断の範囲内で担当医師によって決定されることが理解される。任意の特定の患者に対する具体的な治療有効投与量レベルは、処置される疾患および疾患の重症度、使用する具体的な抗体の活性、使用する具体的な組成物、患者の年齢、体重、全般的な健康状態、性別および食事、投与時刻、投与経路、および使用する具体的な抗体の排泄速度、処置期間、使用する具体的な抗体と組み合わせるまたは同時に使用する薬物、および医学分野において周知の同様な因子を含む多種多様な因子に依存する。例えば、所望の治療効果を達成するのに必要なレベルよりも低いレベルで化合物の投与量を開始し、そして所望の効果が達成されるまで投与量を次第に増加させることは当業者の技能内において周知である。

【0054】

本発明の抗体を、中枢神経系の炎症疾病を処置するための任意の他の治療戦略と組み合わせて使用し得る。

【0055】

CXCR4レセプターのアンタゴニストおよびその使用

本発明者らは、チロシン479上のCRMP2のリン酸化が、CXCR4レセプターによって制御されたことを実証した。従って、CXCR4レセプターを阻害することで、チロシン479上のCRMP2のリン酸化が妨げられ、従って、免疫細胞の遊走が減少するだろう。

【0056】

従って、本発明はまた、前記に定義したような免疫細胞の遊走を減少させるために使用するためのCXCR4レセプターのアンタゴニストに関する。好ましくは、CXCR4レセプターのアンタゴニストは、Tリンパ球の遊走を減少させるために使用するものである。

【0057】

本明細書において使用する「CXCR4レセプター」または「フーシン」は、ストロマ細胞由来因子1（SDF-1、CXCL12とも呼ばれる）に特異的なα-ケモカインレセプターであるCXCKEモカインレセプターを指す。

【0058】

10

20

30

40

50

本発明の脈絡において、「CXCR4レセプターのアンタゴニスト」は、CXCR4レセプターに結合することによって直接的に、または間接的に、CXCR4レセプターの下流のシグナルカスケードを阻害する化合物を指す。CXCR4レセプターのアンタゴニストの例としては、CXCR4レセプターに特異的な抗体、AMD070、AMD3100（またはプレリキサホル）、AMD3465、4F-ベンゾイル-TN14003（またはT140）、KRH-3955、およびビシクラムが挙げられる。

【0059】

本発明はまた、前記に定義したような中枢神経系の炎症疾病の処置において使用するための前記に定義したようなアンタゴニストに関する。

【0060】

治療有効量の前に定義したようなCXCR4レセプターのアンタゴニストの、それを必要とする被験体への投与を含む、中枢神経系の炎症疾病の処置法もまた本発明の目的である。

【0061】

本発明のアンタゴニストは、中枢神経系の炎症疾病を処置するための任意の他の治療戦略と組み合わせて使用され得る。特に、本発明のアンタゴニストは、本発明の抗体と組み合わせて使用され得る。

【0062】

本発明は、以下の図面および実施例によってさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】図1は、CXCL12（100 ng/ml）を用いての処理および固定から0、2、5または10分後の極性化CRMP2を有する、コラーゲンIでコーティングされたスライドに付着している、ジャーカット細胞の数（%）を示すヒストグラムを示す。

【図2】図2は、CXCL12（100 ng/ml）だけを用いての処理後、またはCXCL12およびCXCR4アンタゴニストのAMD3100を用いての処理後の極性化CRMP2を有する、コラーゲンIでコーティングされたスライドに付着している、ジャーカット細胞の数（%）を示すヒストグラムを示す。

【図3】図3は、CXCL12（100 ng/ml）を用いて（+）または用いずに（-）10または30分間かけて処理し、溶解し、そして細胞下分画にかけた、ジャーカット細胞の全細胞溶解液、細胞質画分または細胞骨格画分に対して実施したウェスタンブロットの結果を示す。ウェスタンブロットは、抗CRMP2-pep4抗体または抗CRMP-C-ter抗体を使用して実施された。白抜き矢印は、完全長型のCRMP2を示し、そして黒い矢印は切断型のCRMP2を示す。ウェスタンブロットはまた、抗ビメンチン抗体、抗Erk1/2抗体および抗pErk1/2抗体を用いても実施された。ウェスタンブロットの左の数字は、分子量（kDa）を示す。ウェスタンブロットの下に数字は、非処理細胞を用いて得られたシグナル強度と比較した、処理細胞を用いて得られたシグナル強度の相対値を示す。

【図4】図4は、CXCL12（100 ng/ml）を用いて0、2、5、10または30分間かけて処理し、溶解し、そしてリン酸化型の濃縮にかけられた、ジャーカット細胞の全細胞溶解液、非リン酸化タンパク質（素通り画分）またはリン酸化タンパク質（溶出液）に対して実施されたウェスタンブロットの結果を示す。ウェスタンブロットは抗CRMP2-pep4抗体または抗CRMP-C-ter抗体を使用して実施された。白抜きの矢印は完全長型のCRMP2を示し、そして黒い矢印は切断型のCRMP2を示す。ウェスタンブロットはまた、抗Erk1/2抗体および抗pErk1/2抗体を用いても実施された。ウェスタンブロットの左の数字は分子量（kDa）を示す。

【図5】図5は、CXCL12（100 ng/ml）を用いて0、1、2、4、6、10、15または30分間かけて処理したジャーカットT細胞の細胞溶解液に対して実施したウェスタンブロットの結果を示す。ウェスタンブロットは、抗CRMP2-pSer522抗体、抗CRMP2-pThr509/514抗体、抗CRMP-C-ter抗体、抗pE

10

20

30

40

50

r k 1 / 2 抗体および抗 E r k 1 / 2 抗体を使用して実施された。ウェスタンブロットの左の数字は分子量 (k D a) を示す。ウェスタンブロットの下に数字は、非処理細胞を用いて得られたシグナル強度と比較した、処理細胞を用いて得られたシグナル強度の相対値を示す。

【図 6】図 6 は、C X C L 1 2 (1 0 0 ng/ml) を用いて 0、1、2、4、6、1 0、1 5 または 3 0 分間かけて処理したジャーカット T 細胞の細胞溶解液に対して実施したウェスタンブロットの結果を示す。ウェスタンブロットは、抗 C d k 5 - p T y r 1 2 抗体、抗 C d k 5 - p S e r 1 5 9 抗体、抗 C d k 5 抗体、抗 G S K - 3 α - p T y r 2 7 9 抗体、抗 G S K - 3 β - p T y r 2 1 6 抗体、抗 G S K - 3 α 抗体および抗 G S K - 3 β 抗体を使用して実施された。ウェスタンブロットの左の数字は分子量 (k D a) を示す。ウェスタンブロットの下に数字は、非処理細胞を用いて得られたシグナル強度と比較した、処理細胞を用いて得られたシグナル強度の相対値を示す。

【図 7】図 7 は、残基 1 5 ~ 4 8 9 の切断された C R M P 2 の構造のリボンダイアグラムを示す。挿入図は、切断された C R M P 2 の表面図を示し、これは残基 R 4 6 7、P 4 7 0 および P 4 7 3 の表面露出を示す (濃灰色)。

【図 8】図 8 は、C R M P 2 - G S T または G S T に結合したセファロース - 4 B ビーズと共にインキュベーションした初代 T リンパ球または D e v 神経細胞の細胞溶解液に対して実施したウェスタンブロットの結果を示す。ウェスタンブロットは、抗 Y e s 抗体、抗 C R M P 2 抗体および抗 G S T 抗体を使用して実施された。ウェスタンブロットの左の数字は分子量 (k D a) を示す。

【図 9】図 9 は、A T P の存在下 (+) または非存在下において、活性組換え Y e s を用いて (+) または用いずに、および組換え C R M P 2 を用いて (+) または用いずに実施された in vitro におけるキナーゼアッセイの結果を示す。ウェスタンブロットは、抗リン酸化チロシン残基抗体および抗 C R M P 2 抗体を使用して実施された。ウェスタンブロットの右の数字は分子量 (k D a) を示す。

【図 1 0】図 1 0 は、C X C L 1 2 (1 0 0 ng/ml) を用いて 0、1、2、4、6、1 0、1 5 または 3 0 分間かけて処理したジャーカット細胞の細胞溶解液に対して実施したウェスタンブロットの結果を示す。ウェスタンブロットは、抗 C R M P 2 - p T y r 4 7 9 抗体、抗 C R M P - C - t e r 抗体、抗 C R M P 2 - p e p 4 抗体、抗 S r c - p T y r 4 1 6 抗体および抗 S r c 抗体を使用して実施された。白抜き矢印は完全長型の C R M P 2 を示し、そして黒い矢印は切断型の C R M P 2 を示す。ウェスタンブロットの左の数字は分子量 (k D a) を示す。ウェスタンブロットの下に数字は、非処理細胞を用いて得られたシグナル強度と比較した、処理細胞を用いて得られたシグナル強度の相対値を示す。

【図 1 1】図 1 1 は、C X C L 1 2 (1 0 0 ng/ml) を用いての処理および固定の後に極性化 C R M P 2 を有する、コラーゲン I でコーティングされたスライドに付着している、C R M P 2 F l a g - W T (線入りの棒) または C R M P 2 F l a g - Y 4 7 9 F 突然変異体 (白い棒) を用いてトランスフェクションされた、ジャーカット細胞の数 (トランスフェクションされた細胞数と比較した %) を示すヒストグラムを示す。C R M P 2 は、抗 F l a g 抗体を用いて観察された。

【図 1 2】図 1 2 は、トランスウェルチャンバーにおいて C X C L 1 2 の方向にトランスマイグレーションする、空ベクター (ドットの棒) プラスミド、C R M P 2 F l a g - W T (線入りの棒) プラスミドまたは C R M P 2 F l a g - Y 4 7 9 F (白い棒) プラスミドを用いてトランスフェクションされた、ジャーカット細胞の数を示すヒストグラムを示す。

【図 1 3】図 1 3 は、器官型の海馬切片の近くにスポットされると神経組織上において遊走する、C R M P 2 F l a g - W T (線入りの棒) プラスミドまたは C R M P 2 F l a g - Y 4 7 9 F (白い棒) プラスミドを用いてトランスフェクションされた、ジャーカット細胞の数を示すヒストグラムを示す。

【0 0 6 4】

実施例 1

以下の実施例は、チロシン 479 残基上での CRMP2 のリン酸化が T 細胞の遊走において重要であることを実証する。

【0065】

材料および方法

細胞および抗体

ジャーカット T 細胞株を、10% ウシ胎児血清の補充された RPMI 1640 中で培養した。健康ドナーの血液から選択された初代 T リンパ球を、1~2 週間かけて 10% AB ヒト血清および IL2 (20 U/mL) の補充された RPMI 中で培養した。

【0066】

完全長型および切断型の CRMP2 の両方を認識するウサギポリクローナル抗体が、Rogemond et al. (2008) J. Biol. Chem 283:14751-14761 に記載されている。C-ter および pep4 の抗血清を生成するために使用されたペプチド配列は、それぞれ、CRMP2 配列中の AA557~572 および AA454~465 に局在していた。抗体を、対応する固定化されたペプチド上でのアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。CRMP2-pSer522 および CRMP2-pTyr509/514 を認識するヒツジ抗血清は Kinasource Limited (Dundee, UK) 製であった。本発明者らによって産生されたウサギポリクローナル抗体は、Y479 上でリン酸化されたペプチド AA470~483 (CRMP2-pY479) に対して生じ、そして対応する固定されたペプチド上でのアフィニティクロマトグラフィーによって 2 工程法で精製した (工程 1: 抗非リン酸化ペプチド抗体の排除、工程 2: 抗リン酸化ペプチド抗体の精製)。CRMP2-Y479 ペプチドおよび CRMP2-pY479 ペプチドに対して実施された ELISA は、本発明者らによって産生された抗 CRMP2-pY479 抗体の特異性を示した。さらに、ホスファターゼ CIP を用いての T 細胞溶解液の処理は、ウェスタンブロットにおける陽性シグナルをかなり減少させた。Yes キナーゼに対するウサギポリクローナル抗体は Upstate 製であった。マウス抗ビメンチン/LN6 抗体は Calbiochem 製であった。Cell Signaling 製の抗 Erk 抗体および抗リン酸化 Erk 抗体は、非リン酸化およびリン酸化 p44/42 MAP キナーゼ (Erk1 および Erk2) を認識した。抗 Cdk5 抗体、抗 CDK5-pTyr15 抗体、抗 Cdk5-pSer159 抗体および抗 Src 抗体は、Santa Cruz Biotechnology 製であった。ウサギ抗リン酸化 Src ファミリー抗体は Cell Signaling 製であり、そしてこれは Src、Lyn、Fyn、LCK、Hck および Yes 上におけるリン酸化 Tyr416 を認識した。ウサギ抗 GSK-3 抗体は Chemicon International 製であった。Upstate Millipore 製のマウス抗 pGSK-3 抗体は、活性型の GSK-3 α (pTyr279) および GSK-3 β (pTyr216) を認識した。ホスホ濃縮磁気ビーズ (TALON (登録商標) PMAC) を Clontech から購入した。

【0067】

プラスミドおよび構築物

CRMP2-Flag-wt プラスミドは、Rogemond et al. (2008) J. Biol. Chem 283:14751-14761 に記載されている。簡潔に言うと、完全長 CRMP2 を PCR によって増幅し、そして pCMV2-FLAG ベクター (Sigma, l'Isle d'Abeau, France) に一方向に挿入した。

【0068】

突然変異: 2 工程の PCR 手順を使用して、CRMP2-Y479 F 突然変異体を生成した。最初に、Y479-F 突然変異を含む C 末端フラグメント (471~572) を、3' 末端に EcoRI 部位を導入するリバースプライマー、および F (TTC) で置換されたコドン Y479 (TAC) を有するフォワードプライマーを使用して生成した。次に、この突然変異したフラグメントを、リバースプライマーとして 2 回目の PCR 反応において、5' 末端に HindIII を導入する野生型フォワードプライマーと共に使用した。最終の PCR 産物を、pCMV2-Flag ベクターの HindIII 部位および EcoRI 部位にクローニングし、そして突然変異体の DNA 配列をシーケンスによって確

認した。

【0069】

トランスフェクション：ジャーカットT細胞を、製造業者の指示に従って、Amaxa Nucleofector技術(Koln, Germany)を使用してCRMP2-F1ag-wtプラスミド、CRMP2-F1ag-Y479Fプラスミドおよび空F1agプラスミドを用いてトランスフェクションした。T細胞をトランスフェクションから18時間後に使用した。トランスフェクションされた細胞を、抗F1ag抗体を用いての免疫染色によって可視化した。トランスフェクション率は、大半のF1ag構築物において40～50%に達した。

【0070】

免疫細胞化学

CRMP2型、Yesキナーゼおよび中間径フィラメントのビメンチンを、コラーゲンIでコーティングされたスライド(20 µg/ml)に付着させそして処理(アセトン-20℃; 10分間)により固定されたジャーカット細胞および初代T細胞に対する間接的な免疫蛍光によって検出した。細胞を特異的な抗体と共に(1時間、37℃)、その後、Alexa488または546にコンジュゲーションした抗マウスまたは抗ウサギまたは抗ヒツジIgG抗体と共に(1時間、37℃)インキュベーションし、そしてAxioplan II 蛍光顕微鏡(Carl Zeiss)を使用して調べた。核対比染色を、蛍光DNAインターカレート剤である4',6'-ジアミジノー2-フェニルインドール(DAPI, Boehringer Mannheim)を使用して実施した。

【0071】

タンパク質相互作用アッセイ (プルダウンGST-CRMP2)

前記のように調製した100 µlのジャーカット細胞溶解液を、グルタチオンセファロース4B (Pharmacia Biotech) に結合させた(4℃で1時間)80 µlのGST-CRMP2融合タンパク質または80 µlのGSTタンパク質のいずれかに加えた。GST-CRMP2ビーズおよびGSTビーズを4回洗浄し(50mMトリス(pH7.4)、1mMEDTA、150mM NaCl、および0.5% Nonidet P40)、そしてCRMP2ビーズにまたはGSTビーズのみに結合したタンパク質を溶出した。GST (GSTビーズにおける)、YesおよびCRMP2 (GST-CRMP2ビーズにおける)並びにGST (GSTビーズおよびGST-CRMP2ビーズにおける)をウェスタンブロットによって明らかとした。

【0072】

ウェスタンブロット

CXCL12による処理後、細胞を、ホスファターゼ阻害剤(フッ化Na 5mM、ピロリン酸Na 1mM、β-グリセロリン酸 1mM、オルトバナジン酸 1mM)およびプロテアーゼ阻害剤カクテルコンプリートTM (Roche)の補充されたホモジナイゼーション緩衝液(トリス 20mM、EDTA 1mM、EGTA 5mM、スクロース 10%、pH7.4)中に溶解した。溶解液を超音波にかけて、細胞凝集物を解離させ、そして全タンパク質をローリーアッセイ(Bio-Rad)によって測定した。タンパク質試料(10～20 µg)を還元条件下でドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にかけ、そして遮断溶液(PBS、0.1% Tween 20、5%無脂肪ドライミルク、1時間)と共に前もってインキュベーションしたニトロセルロースメンブレン(BA85; Schleicher & Schuell Microscience)に転写し、そして特異的な抗体に対してブロッティングし(一晩、4℃)、その後、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)に結合させたウサギおよびヒツジのIgG抗体と共にインキュベーションし(1時間、室温)、そして化学発光(ECL)検出システム(Coalab Lyon, France)を行なった。イムノブロットバンドの濃度定量をImage Quant (Molecular dynamics)を使用して実施し、そしてデータをあらゆる処理の前に検出された量に対する比として表現した。

【0073】

データベースおよび構造分析

予測プログラムPROSITE (<http://us.expasy.org/prosite>)を使用して、CRM

10

20

30

40

50

P 2 上における推定チロシンキナーゼ部位を同定した。C R M P 2 の構造を、C R M P 2 の D 鎖について入手可能な座標に基づいて(Stenmark et al. (2007) J. Neurochem. 101: 906-917) (タンパク質データベースエントリー2GSE)、Viewerlite/4.2 (Accelrys)を使用してモデリングした。

【0074】

C R M P 2 のクローニングおよび発現

ヒト C R M P - 2 に対するコード配列 (N M _ 1 3 8 6) を、発現ベクター p E t 2 1 b (Novagen) にサブクローニングし、その結果、N 末端にヘキサヒスチジンタグを有する構築物が得られた。このプラスミドを、Escherichia coli BL21(DE3)細胞に形質転換した。発現のために、細胞を、バブル型フラスコ中の 1 5 0 0 mL の T B 培地 (7 % グリセロール、5 0 μ g / m l のカナマイシンおよび 1 0 0 μ L の B R E O X を含む) 中で増殖させた。細胞を + 3 7 ° C で、6 0 0 n m における吸光度が 2 . 5 に到達するまで増殖させた。培養液を + 1 8 ° C まで水浴中で 1 時間かけて冷却した。C R M P - 2 の発現を、0 . 5 m m o l / L の I P T G の添加によって誘導し、そして発現を + 1 8 ° C で一晩かけて継続させた。細胞を遠心分離によって収集し、そしてペレットを、コンプリート E D T A フリープロテアーゼ阻害剤 (Roche, Basel, Switzerland) および 2 0 0 0 U のベンゾナーゼの補充された溶解緩衝液 (2 0 m m o l トリス、5 0 0 m m o l N a C l 、1 m m o l D T T 、2 0 % グリセロール、0 . 1 % トリトン、1 0 m m o l イミダゾール) 中に懸濁した。溶液を氷上で数サイクルの間、超音波にかけた。試料を 1 4 , 0 0 0 g で 4 ° C で 3 0 分間遠心分離にかけ、そして上清を、溶解緩衝液 (Q I A G E N) 中に 5 0 % 再懸濁した 1 . 5 m l の N i - N T A 樹脂と共に 4 ° C で 9 0 分間かけてインキュベーションした。H i s タグのついたタンパク質を、洗浄緩衝液 (2 0 m m o l トリス、5 0 0 m m o l N a C l 、1 m m o l D T T 、2 0 % グリセロール、0 . 1 % トリトン、2 0 m m o l イミダゾール) 中の N i 樹脂から精製し、そして溶出緩衝液 (洗浄緩衝液 + 1 5 0 m m o l イミダゾール) を用いて 1 m l の画分ずつ溶出した。画分を S D S - P A G E によって評価した。

【0075】

in vitro における Y e s キナーゼアッセイ

アッセイ前に、H i s タグのついた C R M P 2 を、製造業者の指示に従って、Float-A-lyzer 技術 (Interchim) を使用して一晩かけて 4 ° C で緩衝液 (4 0 m m o l M O P S 、0 . 5 m m o l E D T A 、5 % グリセロール) 中で透析した。Y e s キナーゼアッセイのために、0 . 6 μ g の透析された H i s タグのついた C R M P 2 を、酵素希釈緩衝液 (2 0 m m o l M O P S p H 7 、1 m m o l E D T A 、0 . 0 1 % B r i j 、0 . 1 % β - メルカプトエタノール、5 % グリセロール) 中に事前に希釈された 2 0 n g の組換え完全長ヒト Y e s (Millipore) と共にインキュベーションした。反応を、5 0 μ l の反応緩衝液 (8 m m o l M O P S 、0 . 2 m m o l E D T A 、3 0 m m o l M g C l ₂ 、2 m m o l E G T A 、1 0 m m o l β - グリセロリン酸、0 . 4 m m o l N a ₃ V O ₄ 、0 . 4 m m o l D T T 、2 0 0 μ M A T P) 中で 3 0 ° C で 3 0 分間かけて行なった。反応をローディング緩衝液を用いて停止し、そして混合物を S D S - P A G E ゲル上で分離した。

【0076】

トランスマイグレーションアッセイ

T 細胞のトランスマイグレーションを、マイクロトランスウェルシステム (Costar Transwell 支持体 - A) および器官型のマウス脳培養液 (B) の両方においてジャーカット T 細胞を用いて実施した。

【0077】

A : トランスマイグレーションを、3 回、トランスウェルシステム (ボイデンチャンバー、Costar、直径 5 μ m の孔サイズのメンブレン) 中で Vincent et al. (2005) J. Immunol. 175:7650-7660 に記載のように実施した。簡潔に言うと、T 細胞調製物 (3 × 1 0 ⁵ 個の細胞 / ウェル) を上のチャンバーに加え、そして C X C L 1 2 を下の区画に加えた (1 0 n g / m l) 。3 7 ° C で 2 時間インキュベーションした後、下のチャンバー中で遊走している細胞を、顕微鏡下で計測した (少なくとも 3 0 か所の視野を調べた) 。

【0078】

B：神経組織上におけるT細胞のトランスマイグレーションを、以下のように調製した海馬培養液上でアッセイした。生後（P7）C57BL/6マウスの海馬を解剖し、そしてグルコース（6.5mg/ml）の補充された冷ゲイ平衡化溶液中に直ちに投入した。400μmの切片を、McIlwainティッシュチョッパーを使用して海馬の中隔側頭軸に対して垂直に切断した。切片を過剰な組織については注意深く整え、そして6つの切片を、6ウェルプレート中の30mmの半透過性メンブレンインサート（Millicell-CM, Millipore）上に置いた（各々のウェルは1mlの培養培地を含む）。培養培地は、50%最小必須培地（Gibco）、25%ハンク平衡塩溶液、25%熱不活化ウシ血清（Gibco）、1%1-グルタミン200mM（Gibco）および6.5mg/ml D-グルコースから構成された。プレートを37℃および5%CO₂でインキュベーションした。培養培地を1週間に2回交換した。ex vivoにおいて生体の蛍光色素カルボキシフルオレセインサクシニミジルエステル/CFSE（1mM、5分間、37℃）を使用して染色されたジャークットT細胞（1つの切片あたり1×10⁶個の細胞）を、海馬切片（1週間培養液）の近くにスポットした。37℃で18時間接触させた後、切片をD-MEMを用いて十分に洗浄し、エタノールで固定し（10分間、4℃）、そして核対比染色のためにDAPIと共にインキュベーションした。蛍光顕微鏡下で計測された浸潤リンパ球の数は、CRMP2-Y479-Fを用いてトランスフェクションされたT細胞個体群において減少した。

10

【0079】

統計分析

2つの平均の比較における統計学的有意性は、独立スチューデントt検定を用いて試験され、0.05未満のp値を有意と考えた。遊走試験においては、遊走リンパ球の数を光学顕微鏡（1条件あたり15～20個の顕微鏡視野、2回または3回の独立した実験）によって計測し、そしてデータを、1視野あたりの遊走リンパ球の平均数として表現した。

20

【0080】

結果

CXCL12は、Tリンパ球の尾足におけるCRMP2の極性化を誘導する

ケモカインとCRMP2との間の連関を定義するために、本発明者らはまず、CXCL12シグナリング下におけるジャークットT細胞におけるCRMP2の局在を調べた。本発明者らは、完全長および切断産物のCRMP2を認識する2つの異なる抗CRMP2抗体（抗C-ter抗体および抗pep4抗体）を使用した。非処理T細胞の免疫蛍光研究は、CRMP2が、点状のドットとしてT細胞の細胞質内に見られたことを明らかにした。CXCL12による処理下において、CRMP2は、2分以内に細胞の後縁に移動し、そして10分間の処理後に大半の極性化した細胞において準排他的な尾足における局在を示した。CRMP2極性化のこのような現象は、処理から30分後にも依然として観察された。非処理ジャークットT細胞は、細胞において非対称的なCRMP2の分布を示したが、CXCL12の処理後に1.6～2倍の増加が観察された（図1）。同じようなCRMP2の再局在化が、抗pep4抗体染色によっても観察された。さらに、尾足へのCRMP2の分布が、ビメンチンの再局在化と同時に起こり、このビメンチンは極性化しているT細胞の後縁に迅速に再分布した。興味深いことに、CRMP2の再局在化は、CXCL12レセプター（CXCR4）のアンタゴニストであるAMD3100の存在下において非常に大きな程度で逆行し（35%の減少）、結果として、CXCL12誘導応答の特異性が確認された（図2）。これらの結果は、ケモカインが、ビメンチンと協奏して、Tリンパ球において、すなわちフレキシブルな尾足構造へと、CRMP2の動的な再局在化を誘導し得るという意見を支持した。

30

40

【0081】

CXCL12は、細胞骨格へのCRMP2の結合をモデュレーションする。

T細胞の尾足にはビメンチンおよび微小管が豊富であり（Serrador et al. (1999) Trends Cell Biol. 9:228-233）、この2つの細胞骨格エレメントは両方共に、CRMP2の結合対（Vincent et al. (2005) J. Immunol. 175:7650-7660; Gu et al. (2000) J. Bio

50

l. Chem. 275:17917-17920) 並びに T リンパ球の極性化および遊走におけるアクター (Krummel et al. (2006) Nat. Immunol. 7:1143-1149) として記載されていることは周知である。このことから、本発明者らは、C X C L 1 2 が、細胞骨格への C R M P 2 の結合をモデレーションして、T 細胞の運動性を促進し得ると仮定した。C X C L 1 2 による処理後 (100 ng/ml、10 分間および 30 分間)、細胞下分画をジャーカット T 細胞抽出物に対して実施して、細胞骨格エレメントおよび会合タンパク質を細胞質画分から単離した。ビメンチン、チューブリン P A R P および H s p 90 に対する抗体を使用する細胞下分画の同定は、細胞骨格画分と細胞質画分との間のコンタミが全くないことを示した。細胞骨格画分は、中間径フィラメントのビメンチンを示したが、チューブリンは含まず、これはおそらく、チューブリンが細胞質に見られるので脱重合に起因する。その後、異なる画分を、抗 C R M P 2 抗体を使用してウェスタンブロットにかけた。非処理細胞の全細胞溶解液において、抗 C - t e r 抗体は、以前に記載された完全長 C R M P 2 (62 kDa) に対応する C R M P 2 バンド、およびより高い分子量を有するバンドを明らかにした (図 3)。抗 p e p 4 抗体は主に、神経細胞において報告されているような (Rogemond et al. (2008) J. Biol. Chem. 283:14751-14761)、切断型の C R M P 2 に対応する 58 kDa バンドを認識した。抗 p e p 4 抗体の親和性は、完全長型よりも切断型に対しての方が高かった。C X C L 1 2 による処理後、その効率を E r k 1 / 2 リン酸化によって評価し (図 3)、C R M P 2 発現の差異は全細胞溶解液においては検出できなかった。しかしながら、C R M P 2 型の分布は調べた T 細胞の区画によって異なった。完全長 C R M P 2 およびより高い分子量バンドは細胞質画分に見られた。これらは C X C L 1 2 処理下において主な変化を示さなかった。C R M P 2 はまた、62 kDa の完全長型および 58 kDa の切断型として細胞骨格画分においてより少ない程度で見られた。興味深いことに、両方の型の発現は、C X C L 1 2 による処理の後に増強された。切断された C R M P 2 の大半が核に見られ、そして C X C R 4 による活性化下で改変されなかったことは注記すべきである。これらの結果は、C R M P 2 が T リンパ球の細胞骨格区画に分布し、そして C X C L 1 2 はこの分布を変化させ、細胞骨格エレメントと C R M P 2 の会合を増強する能力を有することを示した。

10

20

【0082】

C X C L 1 2 は、C R M P 2 のリン酸化を増加させる。

神経細胞における C R M P 2 の機能的調節は主に、特に G S K - 3 β キナーゼ活性および C d k 5 のキナーゼ活性を介する、そのリン酸化状態に依存する (Uchida et al. (2005) Genes Cells 10:165-179)。それ故、本発明者らは、T リンパ球において、C X C L 1 2 が、そのリン酸化のモデレーションを通して、細胞骨格への C R M P 2 の結合を改変し得るかどうかを研究した。C R M P 2 のリン酸化を評価するために、本発明者らは、C X C L 1 2 (100 ng/ml) による処理後にジャーカット T 細胞の全細胞抽出物に対してリン酸化タンパク質濃縮アッセイ (TALON (登録商標) PMAC Clonetechn) を実施し、そして処理から 2、5、10 および 30 分後にウェスタンブロットによって非リン酸化画分 (素通り画分) およびリン酸化画分 (溶出液) に対してイムノブロットを行なった。抗 C - t e r 抗体によって明らかとなった完全長 C R M P 2 型は、非リン酸化画分およびリン酸化画分の両方に存在した (図 4)。これに対し、切断型の C R M P 2 は、リン酸化タンパク質プールにおいてのみ見られ、このことは、この型が、大部分はリン酸化されていることを示す。C X C L 1 2 による処理は、C R M P 2 リン酸化型のレベルを急速に増加させ、処理から 2 分後にピークに達し、そして依然として 30 分後にも高かった。リン酸化タンパク質濃縮手順の効率は、リン酸化 E r k 1 / 2 イムノブロットによって確認され、これは、溶出液中のリン酸化タンパク質の特異的存在、および同時に、C X C L 1 2 による処理後の増加を確認した。健康ドナーから単離した初代 T リンパ球に対して実施された類似の実験は類似の観察を示した。C X C L 1 2 に応答した C R M P 2 リン酸化のより正確な評価を、それぞれ C d k 5 キナーゼおよび G S K - 3 キナーゼによってターゲティングされる 2 つの部位を認識する、抗 C R M P 2 - p S e r 5 2 2 抗体および抗 C R M P 2 - p T h r 5 0 9 / 5 1 4 抗体を使用して実施した (図 5)。ジャーカット細胞溶解液の

30

40

50

イムノプロットは、C R M P 2 - p S e r 5 2 2 および C R M P 2 - p T h r 5 0 9 / 5 1 4 が、T 細胞において完全長 6 2 k D a の C R M P 2 として存在し、そしてケモカイン処理中に種々に発現され、その効率はリン酸化 E r k 1 / 2 の検出によって確認された。S e r 5 2 2 リン酸化は比較的低いレベルで見られたが、T h r 5 0 9 / 5 1 4 リン酸化は、4 分後までに急速に減少し、そしてその後は検出できなかった。これは、C d k 5 キナーゼおよび G S K - 3 キナーゼの活性型である、C d k - p T y r 1 5、C d k 5 - p S e r 1 5 9、G S K - 3 α - p T y r 2 7 9 および G S K - 3 β - p T y r 2 1 6 の検出によって評価される、C d k 5 キナーゼおよび G S K - 3 キナーゼの活性と一致した（図 6）。C d k 5 は、T y r 1 5 および S e r 1 5 9 上において安定したレベルのリン酸化を示し、C d k 5 の保存された活性化レベルを反映した。これに対し、G S K - 3 は、G S K - 3 β アイソフォーム上で主に検出された脱リン酸化を示し、これは処理から 4 分後に始まる低下した活性を反映した。合わせて考えると、これらの結果が初めて、神経細胞において以前に記載されたように、C R M P 2 残基の S e r 5 2 2 および T h r 5 0 9 / 5 1 4 が T リンパ球においてリン酸化され得ることを明らかとした。より重要なことには、それらは、C X C L 1 2 が、C R M P 2 のこれらの残基のリン酸化の異なるモデュレーションをもたらすシグナルカスケードをトリガーし、すなわち、T h r 5 0 9 / 5 1 4 上におけるリン酸化は正味で減少することを実証する。興味深いことに、これらのモデュレーションは主に完全長型 C R M P 2 上で検出されたが、リン酸化タンパク質濃縮アッセイ（図 4）は、ケモカイン処理後の切断型の C R M P 2 の強力なリン酸化を示した。これにより本発明者らは、C X C L 1 2 に対する C R M P 2 の応答におけるさらに他のリン酸化ターゲットの関与を疑った。

10

20

【0083】

チロシン 4 7 9 は、C R M P 2 配列における新たなリン酸化残基である。

C X C L 1 2 が、L c k、Z A P - 7 0 および I t k を含むチロシンキナーゼの連続的補充および活性化を含む、T リンパ球におけるチロシンリン酸化カスケードをトリガーすることが知られている（Patrussi et al. (2008) Immunol. Lett. 115:75-82）。それ故、本発明者らは、C R M P 2 タンパク質配列を分析することによって、ケモカイン処理下でモデュレーションされる可能性のあるチロシンターゲット残基について探索した。5 7 2 個のアミノ酸のデータベース研究は、残基 4 7 2 ~ 4 7 9 内のリン酸化チロシン共通モチーフ K x x x D x x Y 内に位置する、可能性ある新たなリン酸化残基としてチロシン 4 7 9（Y 4 7 9）を同定した（図 7）。さらに、この領域の検査はまた、Y 4 7 9 の近くの、残基 4 6 7 ~ 4 7 3 内の R x x P x x P 型の推定 S H 3 結合モチーフの存在を示した。結合タンパク質対へのこれらの配列の近づきやすさを評価するために、本発明者らは、フラグメント 1 5 ~ 4 8 9 について入手可能な座標に基づいて、C R M P 2 の既知構造内（図 7）における Y 4 7 9 および S H 3 結合モチーフの両方の位置を評価した（Stenmark et al. (2007) J. Neurochem. 101:906-917）。この C R M P 2 型の表面露出図は、Y 4 7 9 とは対照的に、推定 S H 3 結合モチーフが露出していることを明らかとし、このことは、S H 3 ドメインを有するタンパク質との結合の可能性を示唆する（図 7 の挿入図）。S H 3 ドメイン結合モチーフとの相互作用は、タンパク質コンフォメーション変化を誘導し（Martinez and Serrano (1999) Nat. Struct. Biol. 6:1010-1016）、よって前記タンパク質コンフォメーションがその後の Y 4 7 9 の露出の基礎であり得ることが示された。これらの観察は、C R M P 2 配列内の主要な推定リン酸化チロシンとしての Y 4 7 9 を示唆した。

30

40

【0084】

C R M P 2 のチロシンリン酸化は、S r c ファミリーキナーゼ Y e s によって行なわれ、そしてこれはケモカイン処理下で増加する。

潜在的なリン酸化可能な部位 Y 4 7 9 に近い推定 S H 3 結合モチーフの存在の観点から、その S H 3 ドメインを通じた C R M P 2 とチロシンキナーゼとの間の可能性ある相互作用を研究した。これは、活性コンフォメーションで折りたたまれたままであるいくつかのタンパク質 S H 3 ドメインを有するメンブレンアレイを使用して実施された。1 0 個の異

50

なるリンパ球チロシンキナーゼ（エーベルソンキナーゼ（A b l）、S r cファミリーキナーゼ（L c k、Y e s、c-S r c、F y n、H c k、B l k）およびT e cファミリーキナーゼ（I t k、T x k、B l k）を含む）がこのアレイに存在した。H i s タグのついた組換えC R M P 2のハイブリダイゼーション後、タンパク質-タンパク質相互作用を、抗H i s 抗体を使用して可視化し、そしてスポット強度は相互作用の強度を明らかにした（表1）。

【0085】

表1：SH3タンパク質-C R M P 2の相互作用の同定

C R M P 2-H i s 組換えタンパク質を、製造業者の指示に従って、38個のタンパク質のSH3ドメインを用いて2回スポットされたメンブレン（TranSignal™ SH3ドメインアレイ I-Panomics）と共にインキュベーションした。抗H i s 抗体は、いくつかのチロシンキナーゼタンパク質のSH3ドメインを含む、複数のSH3ドメインとC R M P 2との会合を明らかにした。スポット強度（-から+++まで）は、リガンドC R M P 2に対するSH3ドメインの結合親和性を示し、そしてC R M P 2についての強力なチロシンキナーゼ候補としてのY e sを明らかにした。

【0086】

【表1】

		C R M P 2との 相互作用の強度
チロシンキナーゼタンパク質		
Yes1	山口肉腫ウイルス発癌遺伝子ホモログ1	++
Abl	エーベルソンチロシンキナーゼ	+
BLK	Bリンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ	+
LCK	ヒトTリンパ球特異的タンパク質チロシン	-
FYN	癌原遺伝子チロシンタンパク質キナーゼ	-
BTK	ブルトンチロシンキナーゼ	-
c-Src	細胞性ラウス肉腫ウイルス発癌遺伝子ホモログ1	-
Hck	造血細胞キナーゼ	-
TXK	チロシンタンパク質キナーゼT X K	-
Itk	インターロイキン-2誘導性T細胞キナーゼ	-
非キナーゼタンパク質		
PLC-γ	ホスホリパーゼC γ 1	+++
VAV1	V a v 癌原遺伝子SH2ドメイン1	++
PI3beta	ホスホイノシチド-3-キナーゼp 85調節βサブユニット	++
ITSN-D1	インターセクション、SH3ドメイン1番	+

【0087】

Y e s キナーゼは、C R M P 2への強い結合を示したが、B l kおよびA b lは弱いシグナルを示した。さらに、V a v 1、P L C γ、I T S NおよびP I 3 βに属する4つの非キナーゼタンパク質SH3ドメインもまた、C R M P 2への強い結合を示した。興味深

いことに、P L C γ および I T S N は以前に、C R M P 2 に対する結合対として観察されている (Quinn et al. (2003) J. Neurosci. 23:2815-2823; Buttner et al. (2005) Biochemistry 44:6938-6947)。その後、本発明者らは、C R M P 2 リン酸化についてのより強力なチロシンキナーゼ候補である Y e s に焦点を当てた。

【0088】

Y e s / C R M P 2 相互作用をいくつかのアプローチによって評価した。まず、これらのタンパク質の局在を、コラーゲン I でコーティングされたカバーガラスに付着させ、そしてその後、C X C L 1 2 (100 ng/ml、5 分間) で処理した、初代 T リンパ球およびジャーカット T 細胞上で評価した。抗 Y e s 抗体および抗 p e p 4 抗体を用いて実施された免疫蛍光は、特に極性化した T 細胞の尾足における、C R M P 2 および Y e s の共分布を示した。Y e s / C R M P 2 の相互作用を次に、初代 T リンパ球および神経細胞 (D e v 細胞株) (C R M P 2 はまた、中枢神経系 (C N S) における運動性にも関与しているため) からの細胞溶解液を使用して G S T プルダウンアッセイによって調べた (図 8)。グルタチオン-セファロースビーズ上に固定された C R M P 2 を細胞溶解液と共にインキュベーションした。両方の細胞型からの溶出液に対して実施されたウェスタンブロットは、C R M P 2 - G S T と会合した Y e s タンパク質の存在は示したが、G S T のみと会合したものは示さなかった。合わせて考えると、これらの結果は、C R M P 2 に対する強力な結合対としての Y e s キナーゼを規定した。この相互作用の機能的意義を評価するために、in vitro におけるキナーゼアッセイを、活性組換えヒト Y e s キナーゼおよび基質としての H i s タグのついた C R M P 2 を使用して実施した (図 9)。リン酸化を、イムノブロットによって抗リン酸化チロシン抗体を使用して検出した。対照は C R M P 2 の非存在下において実施され、これは Y e s の自己リン酸化を示した。C R M P 2 のリン酸化に対応するバンドは、A T P の存在下においてのみ検出された。タンパク質リン酸化の結果として、このバンドは、分子量の僅かな増加を示した。

【0089】

T 細胞におけるチロシンリン酸化型の C R M P 2 の存在を確認するために、リン酸化残基 T y r 4 7 9 を含む C R M P 2 配列のフラグメント (A A 4 7 0 ~ 4 8 3) に対するポリクローナル抗体を生じさせた。この抗体を用いてのイムノブロットは、完全長および 58 k D a の切断されたタンパク質の両方として検出された、T リンパ球における C R M P 2 - p T y r 4 7 9 の存在を明らかにした。

【0090】

C X C L 1 2 (100 ng/ml ; 0、1、2、4、6、10、15、30 分間) を用いて処理したジャーカット T 細胞における C R M P 2 - p T y r 4 7 9 の調査は、T y r 4 7 9 リン酸化の増加を示し (図 10)、これは主に処理から 8 ~ 14 分後に観察された。C R M P 2 - p T y r 4 7 9 の増加した発現は、C R M P 2 - T h r 5 0 9 / 5 1 4 の減少と同時に起こり、これはその依存性を示唆する。T y r 4 7 9 リン酸化のこのピークは、Y e s を含むリン酸化 S r c ファミリーメンバーを認識する抗体である、抗 S r c - p T y r 4 1 6 抗体を使用したイムノブロットによって示されるように、この時点において S r c - ファミリーキナーゼの活性化と相関した。その後、免疫蛍光を、リン酸化型および非リン酸化型の C R M P 2 に対する抗体を使用して、C X C L 1 2 で処理した (15 分間) ジャーカット細胞に対して実施した。C R M P 2 - p T y r 4 7 9 についての染色は主に、T リンパ球における極性化した分布を伴った。ビメンチンとの共局在は、それぞれビメンチンと会合しているまたは会合していないのいずれかである抗 p e p 4 抗体および抗 C - t e r 抗体によって認識される C R M P 2 型と比較して、リン酸化された C R M P 2 - T y r 4 7 9 は主に、尾を引く極においてビメンチンと共局在することを示した。合わせて考えると、これらの結果は、C X C L 1 2 シグナリングによってモデュレーションされ、細胞骨格エレメントと共局在し、そして S r c - ファミリーキナーゼ Y e s によってターゲティングされ得る、新たな型のリン酸化 C R M P 2 を同定した。

【0091】

C R M P 2 - T y r 4 7 9 リン酸化は、ケモカインにより誘導される T 細胞の極性化およ

び遊走に關与する。

T y r 4 7 9 上における C R M P 2 リン酸化の機能的意義を評価するために、本発明者らは、完全長 C R M P 2 配列上における突然変異 Y 4 7 9 - F を工学操作した。その後、T 細胞の極性化に対する T y r 4 7 9 リン酸化障害の作用を、F l a g のタグのついた C R M P 2 - w t および C R M P 2 - Y 4 7 9 - F 突然変異体を用いて一過性にトランスフェクションされたジャーカット T 細胞において分析した。トランスフェクションから 2 4 時間後、T 細胞をコラーゲン I でコーティングされたスライドに付着させ、その後、C X C L 1 2 で処理し、そして蛍光顕微鏡によって調べた。F l a g 陽性免疫染色によって可視化されるような、トランスフェクションされた T 細胞における C R M P 2 の極性化を、ビメンチンネットワークの共局在化に基づいて調べた。これにより本発明者らは、C R M P 2 - w t または C R M P 2 - Y 4 7 9 - F のいずれかでトランスフェクションされた F l a g 陽性 T 細胞の極性化を評価することが可能となった（全トランスフェクション細胞に対する比率として表現）。C R M P 2 - w t を用いてトランスフェクションされた非処理ジャーカット T 細胞個体群は、約 2 8 % の自発的に極性化した細胞を示したが、これは、C R M P 2 - Y 4 7 9 - F 突然変異体を用いてトランスフェクションされた T 細胞においては明らかに減少した（図 1 1）。C X C L 1 2 による処理後、ビメンチンは、C R M P 2 - w t でトランスフェクションされた T 細胞においては尾足に迅速に再分布した。これに対し、C R M P 2 - Y 4 7 9 - F でトランスフェクションされた細胞は、明らかにあまり極性化しなかった（図 1 1）。さらに、C X C L 1 2 による処理後の極性化した細胞数の増加は、C R M P 2 - w t よりも C R M P 2 - Y 4 7 9 - F を用いてトランスフェクションされたジャーカット T 細胞においての方がより少なく（それぞれ 4 2 % v s 3 1 %）（図 1 1）、従って、T 細胞の極性化に対する T r y 4 7 9 リン酸化の影響が確認された。これらの結果は明らかに、T リンパ球の極性化における C R M P 2 - T y r 4 7 9 リン酸化の役割を示した。

【0092】

T 細胞の極性化は遊走にとって必要条件であるので、本発明者らはさらに、T 細胞の遊走に対する T y r 4 7 9 リン酸化の影響を評価した。従って、本発明者らはまず、トランスウェルチャンバーにおいてトランスマイグレーションアッセイを実施することによって、C X C L 1 2 の方へと、トランスフェクションされたジャーカット T 細胞が遊走する能力を評価した。図 1 2 に示したように、C R M P 2 - Y 4 7 9 - F でトランスフェクションされた細胞の遊走速度は、C R M P 2 - w t および対照細胞（空ベクター）と比較して劇的に減少した。血管を横切るために必要である T 細胞のトランスマイグレーションを超えて、侵入組織内における遊走もまた、特に C N S 内においてはキーポイントである（C N S では C X C L 1 2 およびその同族レセプターが構成的に発現されている）。それ故、本発明者らは、T y r 4 7 9 リン酸化が、神経組織内における T 細胞の遊走に対して影響を及ぼすかどうかを、マウス海馬器官型培養液を使用して調べた。トランスフェクションされたジャーカット T 細胞（4 0 ~ 5 0 % のトランスフェクション効率）を、生体の色素の C F S E で染色することにより、神経組織上および神経組織中の両方においてそれらを容易に可視化した。その後、細胞を脳切片の近くにスポットし、そして 1 8 時間のインキュベーション後に計測した。C R M P 2 - Y 4 7 9 - F でトランスフェクションされた細胞は、野生型のトランスフェクション細胞と比較して、神経細胞上を移動する低下した能力を示した（図 1 3）。これらの結果は、神経組織内の T 細胞の遊走過程における C R M P 2 - T y r 4 7 9 リン酸化の役割を実証した。

【0093】

従って、本発明者らは、チロシン 4 7 9 上のリン酸化が T 細胞の遊走に対して影響を及ぼし、従って、C N S の炎症疾病の予測マーカーとして使用することができることを実証した。

【0094】

実施例 2

本発明者らは、T C R 刺激によって媒介される T リンパ球の活性化が、C R M P 2、よ

り特定すると、国際出願WO2003/022298に記載の抗ペプチド4抗体による切断型のCRMP2の検出の増加をもたらしたことを示した。

【0095】

興味深いことに、これらの抗体は、カラムで濃縮されたリン酸化型のCRMP2を強く認識した。さらに、S465のリン酸化されたCRMP2は、CNSに記載されたリン酸化型のCRMP2の中で主要なリン酸化型のCRMP2である。

【0096】

従って、これらの結果は、切断されたS465リン酸化CRMP2の検出が、TCR刺激によって媒介されるTリンパ球の活性化に関連し、そしてこれをTCR活性化の末梢マーカーとして使用することができることを示唆する。

10

【0097】

実施例3

本発明者らは、HTLV-1感染に関連した多発性硬化症または脊髄症を患う患者において、活性化Tリンパ球の亜個体群（CD69+および／またはHLA-DR+）が、健康被験体よりもより強くCRMP2を発現したことを示した。

【0098】

本発明者らは、この改変が、Tリンパ球の遊走能の増加に関連することを示した。さらに、この増加は、抗CRMP2抗体を使用して阻害され得る。

【0099】

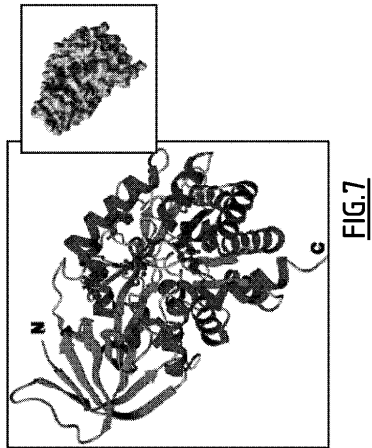
CRMP2の高い発現は、抗ペプチド4抗体を使用して検出された。これらの抗体は特にリン酸化および切断された型のCRMP2を認識するので、この増加した検出はおそらく、CRMP2リン酸化の改変、特に、CRMP2のS465リン酸化に起因する。

20

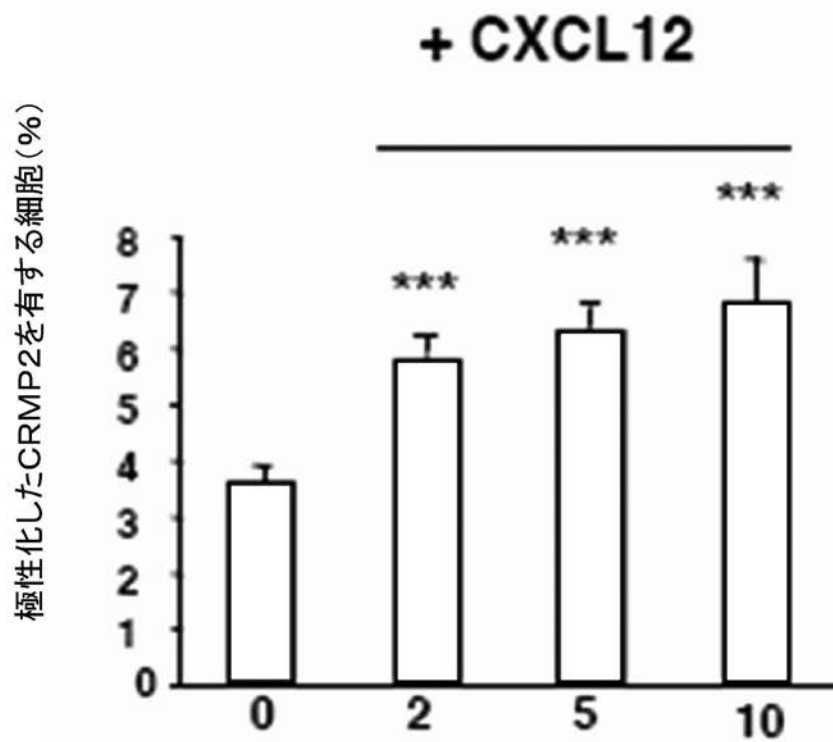
【0100】

従って、これらの結果は、CRMP2の切断およびTリンパ球におけるリン酸化CRMP2の過剰発現が（TCR刺激を介するセリン465上およびケモカイン活性化を介するチロシン479上）、神経炎症過程の末梢マーカーであり、そしてこれを中枢神経系の炎症疾病の早期診断、予知またはモニタリングに使用することができることを実証する。

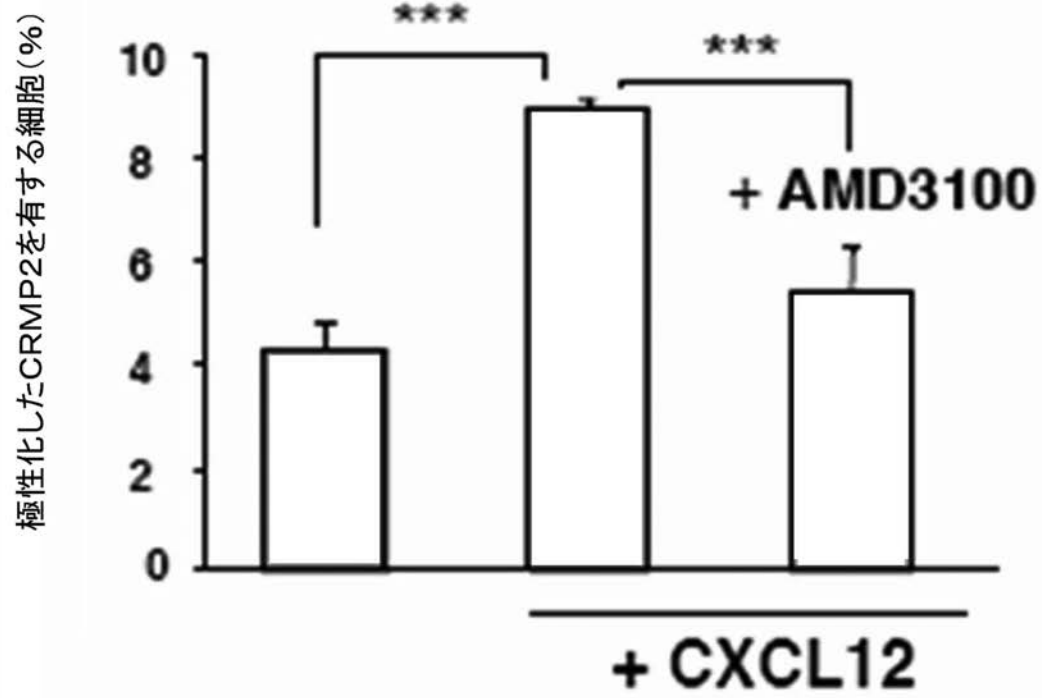
【 図 7 】



【 図 1 】



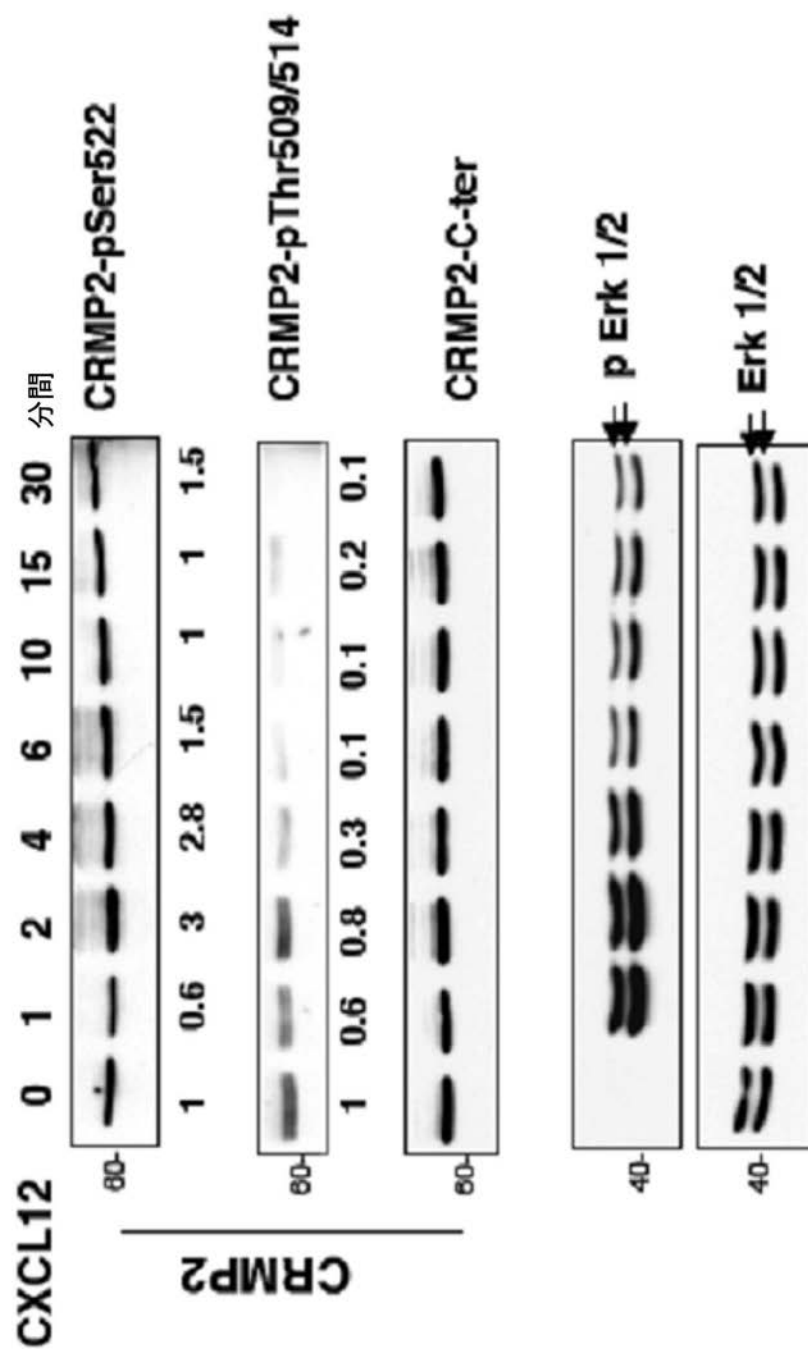
【図 2】



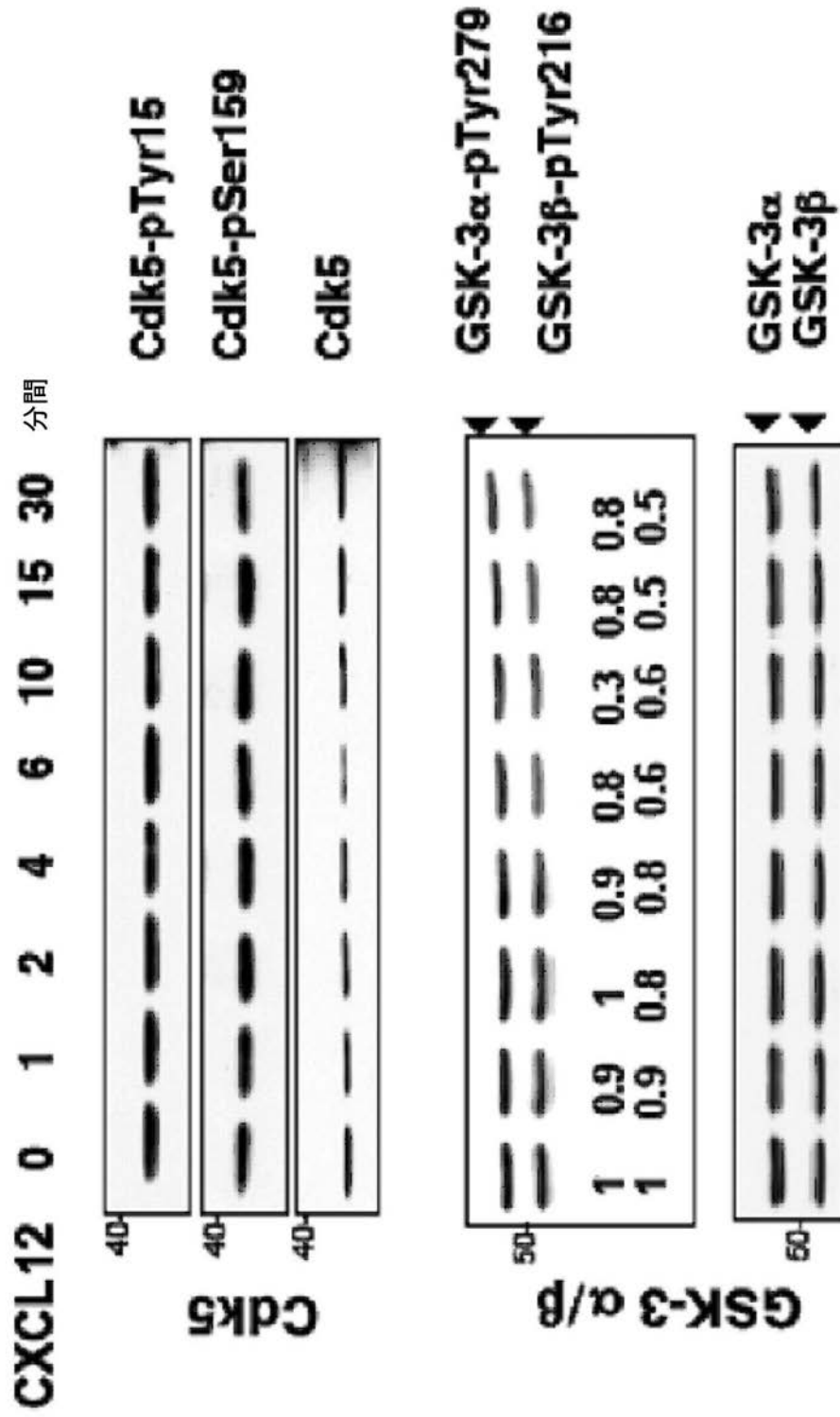
[illegible]

	完全細胞						素通り画分						溶出液					
	0	2	5	10	30	分間	0	2	5	10	30	分間	0	2	5	10	30	分間
CXCL12																		
CRMP2-C-ter																		
CRMP2-pep4																		
GAPDH																		
													p Erk 1/2 Erk 1/2					

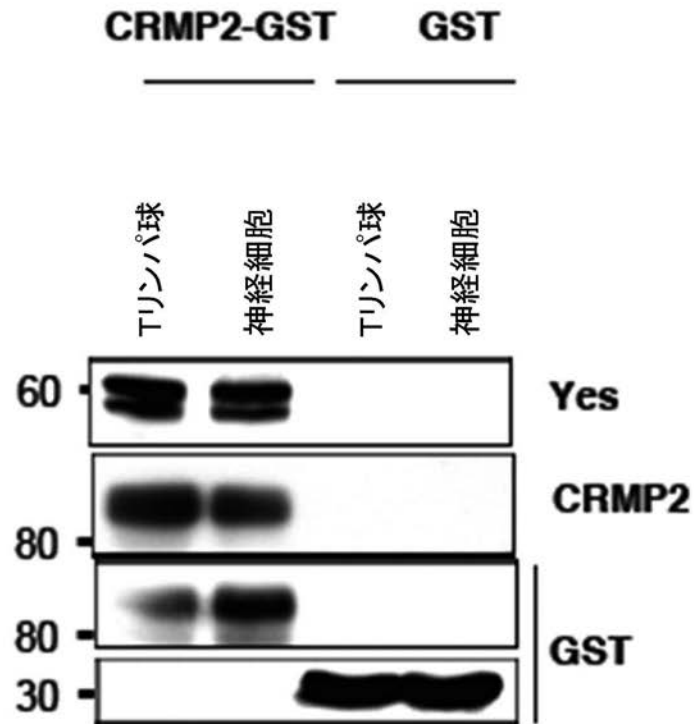
【 図 5 】



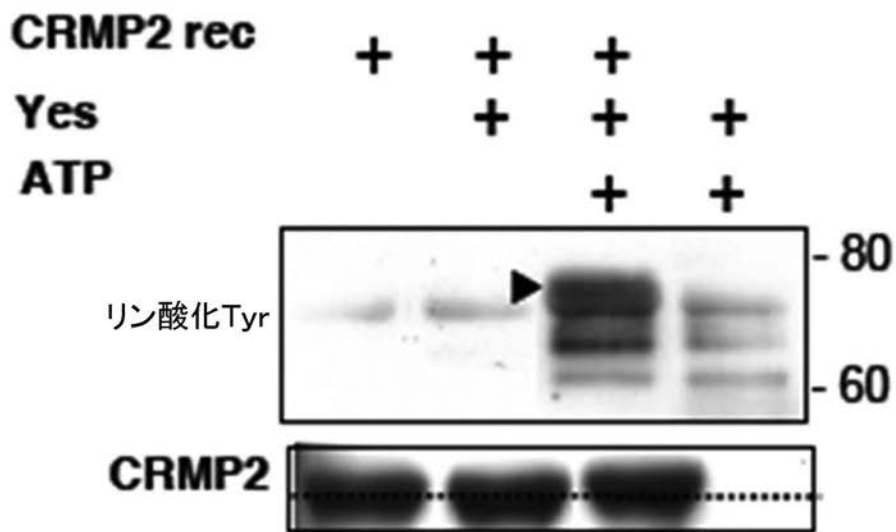
【 図 6 】



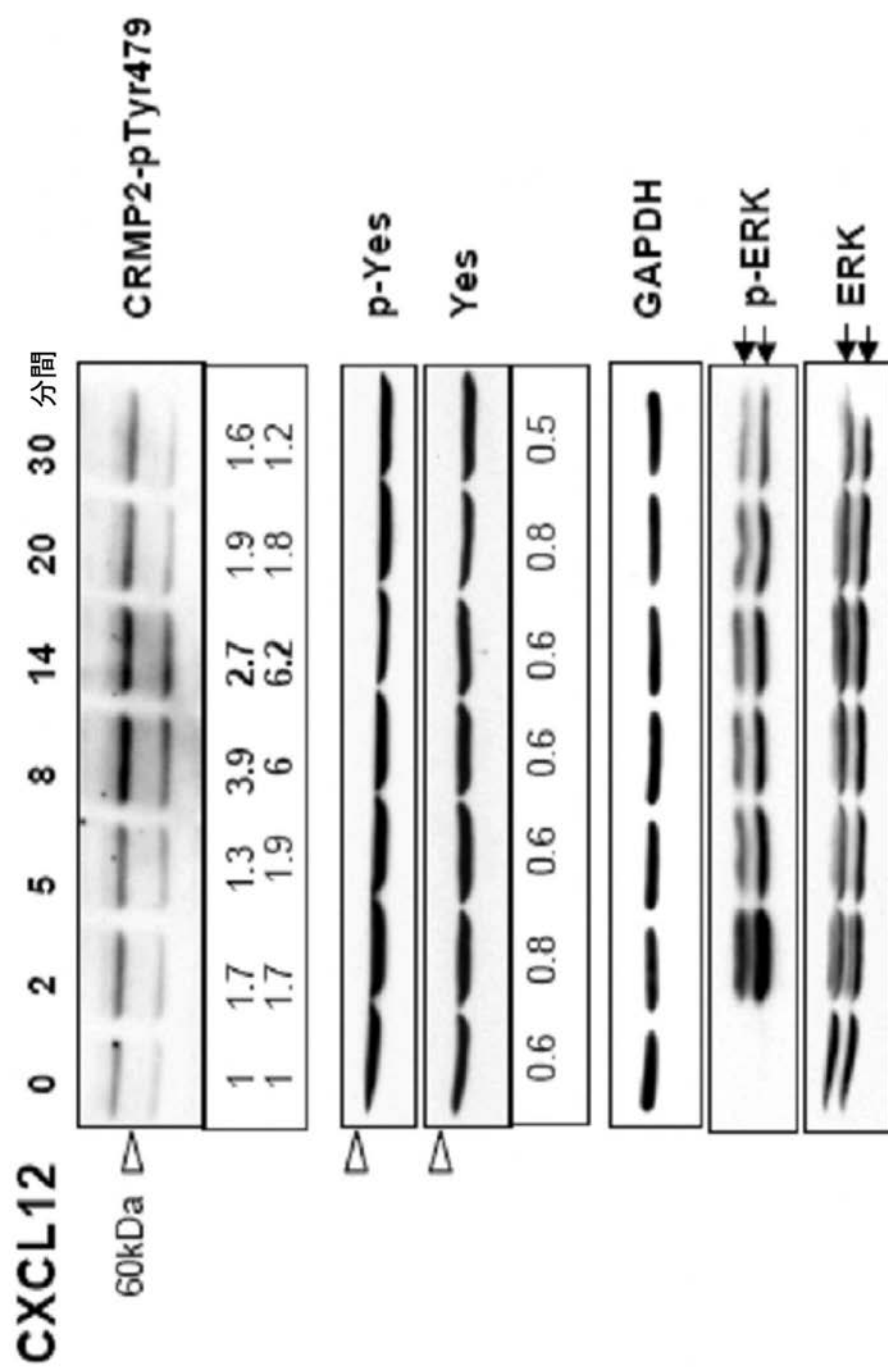
【図 8】



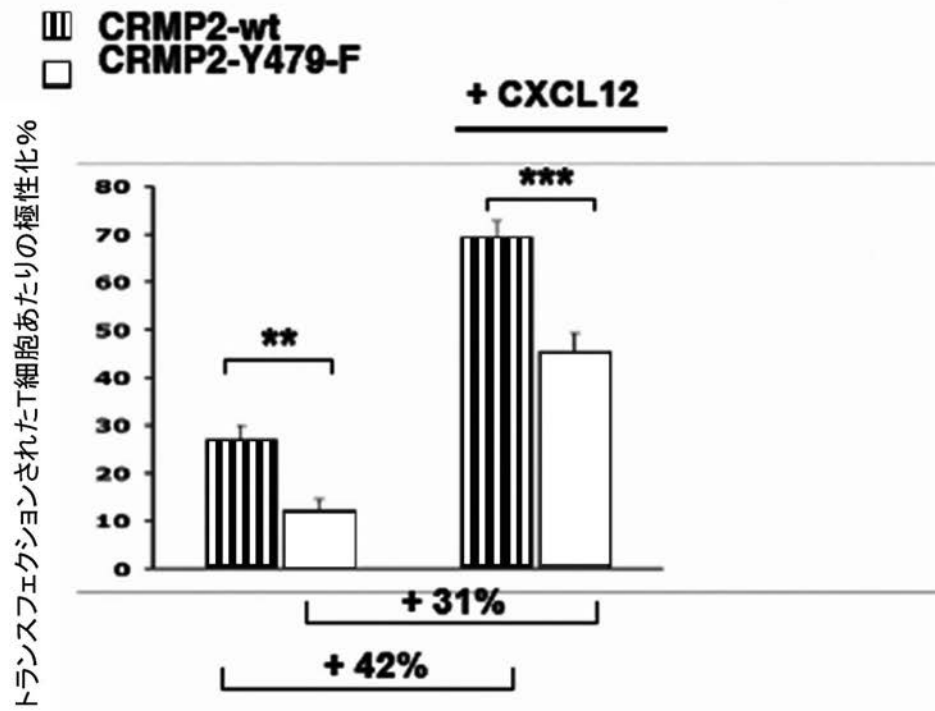
【図 9】



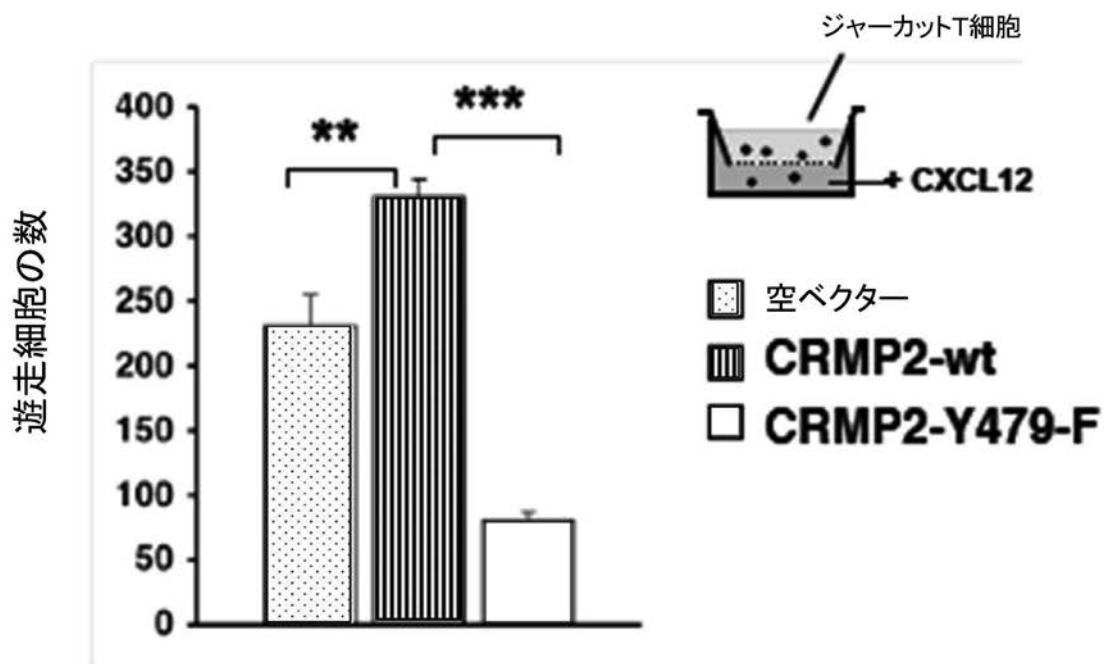
【図 10】



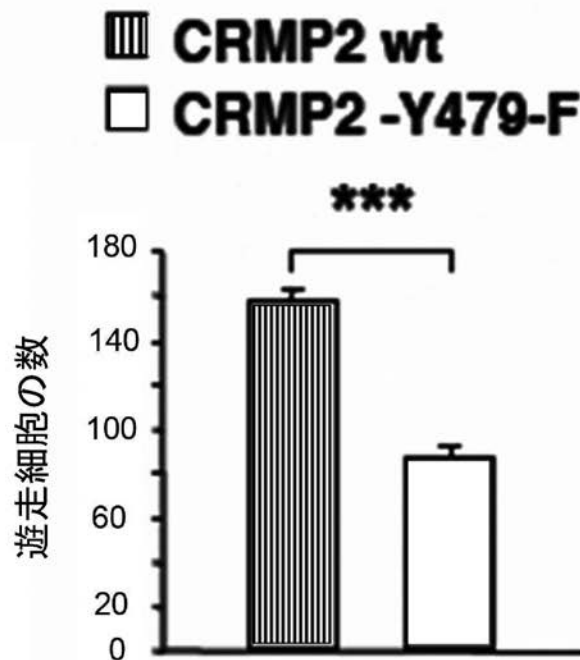
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

2012533079000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年6月26日(2012.6.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における中枢神経系の炎症疾病のin vitroにおける予知、診断および／またはモニタリングのための方法であって、前記方法は、被験体からの免疫系細胞の試料中における、チロシン479（Y479）上でリン酸化されたコラプシン応答媒介タンパク質2（CRMP2）の存在を検出することを含み、Y479のリン酸化されたCRMP2の存在の検出は、中枢神経系の炎症疾病を示す、前記方法。

【請求項 2】

前記のY479のリン酸化されたCRMP2が切断型である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記のY479のリン酸化されたCRMP2が、セリン465（S465）上でさらにリン酸化されている、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

前記のY479のリン酸化されたCRMP2が、Y479のリン酸化されたCRMP2に特異的な抗体を用いて検出される、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

前記の中枢神経系の炎症疾病が、髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脳脊髄炎または脊髄症を伴うウイルス感染または細菌感染、多発性硬化症、パーキンソン病およびアルツハイマー病からなる群より選択される、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6】

チロシン 479 上でリン酸化された C R M P 2 に特異的な抗体。

【請求項 7】

セリン 465 上でリン酸化された C R M P 2 に特異的な抗体。

【請求項 8】

中枢神経系の炎症疾病の予知、診断および／またはモニタリングにおいて使用するための請求項 6 または 7 記載の抗体。

【請求項 9】

免疫細胞の遊走を減少させるために使用するための請求項 6 または 7 記載の抗体。

【請求項 10】

中枢神経系の炎症疾病の処置において使用するための請求項 6 または 7 記載の抗体。

【請求項 11】

前記の中枢神経系の炎症疾病が、髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脳脊髄炎または脊髄症を伴うウイルス感染または細菌感染、多発性硬化症、パーキンソン病およびアルツハイマー病からなる群より選択される、請求項 10 記載の使用のための抗体。

【請求項 12】

チロシン 479 および／またはセリン 465 上でリン酸化された C R M P 2 を検出するための請求項 6 または 7 において定義したとおりの抗体の使用。

【請求項 13】

さらに切断型である C R M P 2 を検出するための、請求項 12 記載の使用。

【請求項 14】

免疫細胞の遊走を減少させるために使用するための C X C R 4 レセプターのアンタゴニスト。

【請求項 15】

中枢神経系の炎症疾病の処置において使用するための、請求項 14 記載の使用のためのアンタゴニスト。

【請求項 16】

前記の中枢神経系の炎症疾病が、髄膜炎、脳炎、脊髄炎、脳脊髄炎または脊髄症を伴うウイルス感染または細菌感染、多発性硬化症、パーキンソン病およびアルツハイマー病からなる群より選択される、請求項 15 記載の使用のためのアンタゴニスト。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2009/054212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VARRIN-DOYER MICHEL ET AL: "Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein 2 on Tyr-479 Regulates CXCL12-induced T Lymphocyte Migration" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 19, 10 March 2009 (2009-03-10), pages 13265-13276, XP002571055 ISSN: 0021-9258 the whole document	6,12-13
A	WO 03/022298 A2 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; GIRAUDON PASCALE [FR]; BELIN MARIE-FRANC) 20 March 2003 (2003-03-20) the whole document ----- -/--	1-13
☒ 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 March 2010		Date of mailing of the international search report 04/08/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Hoff, Céline

Form PCT/ISA/E10 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/054212

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STENMARK PAL ET AL: "The structure of human collapsin response mediator protein 2, a regulator of axonal growth" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 101, no. 4, May 2007 (2007-05), pages 906-917, XP009130308 ISSN: 0022-3042 the whole document	1-13
A	----- SOUTAR M P M ET AL: "Increased CRMP2 phosphorylation is observed in Alzheimer's disease; does this tell us anything about disease development?" CURRENT ALZHEIMER RESEARCH JUN 2009, vol. 6, no. 3, June 2009 (2009-06), pages 269-278, XP009130313 ISSN: 1875-5828 the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2009/054212**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-13

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/IB2009/054212

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-13

A method for in vitro prognosis, diagnosis of inflammatory disease of the central nervous system comprising detecting the presence of CRMP2 which is phosphorylated on tyrosine 479.

2. claims: 14-16

An antagonist of the CXCR4 receptor and its use.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2009/054212

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03022298	A2	20-03-2003	
		AU 2002341090 A1	24-03-2003
		CA 2461692 A1	20-03-2003
		EP 1435993 A2	14-07-2004
		JP 2005508315 T	31-03-2005
		US 2005106143 A1	19-05-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K 16/18

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100131808

弁理士 柳橋 泰雄

(74)代理人 100119079

弁理士 伊藤 佐保子

(74)代理人 100135873

弁理士 小澤 圭子

(72)発明者 ジロードン, パスカル

フランス国、エフー 6 9 3 7 2 リヨン、ローヌ・リュ・ギョーム・パラダン、ファキュルテ・ド
ウ・メドスィーヌ・エール、アンセルム ユ 8 4 2

F ターム (参考) 2G045 AA25 DA36

4C084 AA17 NA14 ZA01 ZA15 ZA16 ZB33 ZB35 ZC41

4C085 AA14 EE01

4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

專利名称(译)	切割作为中枢神经系统的炎性疾病和磷酸化CRMP2的血液标记物		
公开(公告)号	JP2012533079A	公开(公告)日	2012-12-20
申请号	JP2012520111	申请日	2009-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 Yuniberushite克劳德·伯纳德·里昂总理		
[标]发明人	ジロードンパスカル		
发明人	ジロードン,パスカル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 A61K39/395 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P31/12 A61P31/04 A61P43/00 A61K45/00 C07K16/18		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 G01N33/6896		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/68.ZNA A61K39/395.N A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P31/12 A61P31 /04 A61P43/00.111 A61K45/00 C07K16/18		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA15 4C084/ZA16 4C084 /ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZC41 4C085/AA14 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及体外预后，诊断和/或监测受试者中枢神经系统炎性疾病的方法，所述方法包括在来自受试者的免疫系统细胞样品中检测存在一种Collapsin反应介质蛋白2 (CRMP2) 在酪氨酸479 (Y479) 上磷酸化，并任选在丝氨酸465上进一步磷酸化 (S465) ，其中检测到Y479磷酸化CRMP2的存在，其任选在丝氨酸上进一步磷酸化465表示中枢神经系统的炎性疾病。

		CRMP 2 との 相互作用の強度
チロシンキナーゼタンパク質		
Yes1	山口肉腫ウイルス発癌遺伝子ホモログ 1	++
Abl	エーベルソンチロシンキナーゼ	+
BLK	B リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ	+
LCK	ヒトTリンパ球特異的タンパク質チロシン	-
FYN	癌原遺伝子チロシンタンパク質キナーゼ	-
BTK	ブルトンチロシンキナーゼ	-
c-Src	細胞性ラウス肉腫ウイルス発癌遺伝子ホモログ 1	-
Hck	造血細胞キナーゼ	-
TXK	チロシンタンパク質キナーゼTXK	-
Itk	インターロイキン-2 誘導性T細胞キナーゼ	-
非キナーゼタンパク質		
PLC-γ	ホスホリパーゼC γ 1	+++
VAV1	V a v 癌原遺伝子SH 2 ドメイン1	++
PI3beta	ホスホイノシチド-3-キナーゼ p 8 5 調節 β サブユニット	++
ITSN-D1	インターセクチン、SH 3 ドメイン1 番	+