

(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2020-515832

(P2020-515832A)

(43) 公表日 令和2年5月28日 (2020.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 M	2 G 0 4 5
GO 1 N 33/493 (2006.01)	GO 1 N 33/493 A	4 B 0 2 9
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B 0 6 3
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 D	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-551950 (P2019-551950)	(71) 出願人	509305088
(86) (22) 出願日	平成30年3月23日 (2018.3.23)		シャリテールユニベルジテーツメディツイン
(85) 翻訳文提出日	令和1年10月30日 (2019.10.30)		ベルリン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/057493		ドイツ連邦共和国 1 0 1 1 7 ベルリン
(87) 国際公開番号	W02018/177949		, シャリテブラッツ 1
(87) 国際公開日	平成30年10月4日 (2018.10.4)	(74) 代理人	100149032
(31) 優先権主張番号	17162941.3		弁理士 森本 敏明
(32) 優先日	平成29年3月25日 (2017.3.25)	(72) 発明者	エンガード, フィリップ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ドイツ国 ベルリン 1 2 0 4 7 ウェザ
(31) 優先権主張番号	17165128.4		ーストラッセ 2 1 3
(32) 優先日	平成29年4月5日 (2017.4.5)	(72) 発明者	ゴリッシュ, ニナ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ドイツ国 ベルリン 1 0 4 0 5 クリス
			トバーガー ストラッセ 4 0
		最終頁に続く	

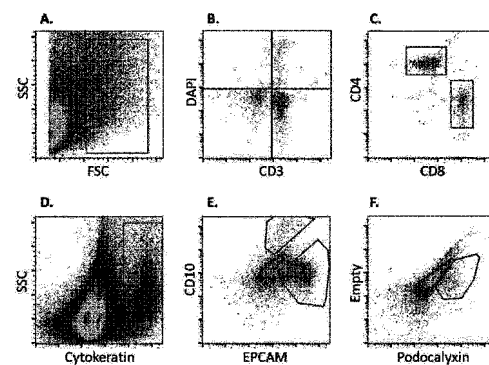
(54) 【発明の名称】 腎疾患のバイオマーカーとしての尿のフローサイトメトリー

(57) 【要約】

本発明は、患者からの尿試料が提供される工程及びT細胞、ポドサイト及び近位尿細管上皮細胞の濃度を測定する工程を含む、腎疾患を有する可能性、又は腎移植拒絶を受けている可能性を患者に割り当てる方法を提供する。これらの細胞型の比率は、腎疾患又は移植拒絶のリスクを測定するために使用される。

【選択図】 図1

Fig. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腎疾患、特に腎移植拒絶、急性腎不全、自己免疫疾患による急性腎不全、ループス腎炎、A N C A 関連糸球体腎炎及び糖尿病性腎疾患を含む群から選択される腎疾患を有する可能性、若しくは腎移植拒絶を受けている可能性を患者に割り当てる方法であって、

- a. 前記患者から得られる尿試料を提供する工程；
- b. 前記尿試料中の T 細胞の濃度、ポドサイトの濃度及び近位尿細管上皮細胞の濃度、並びに任意に遠位尿細管上皮細胞の濃度を測定する工程を含む、前記方法。

【請求項 2】

- 前記 T 細胞は、C D 3、C D 4 及び C D 8 の少なくとも 1 つの発現を特徴とする、
 - 前記ポドサイトは、ポドカリキシン、ポドシン、ネフリン及び W T 1 の少なくとも 1 つの発現を特徴とする、
 - 前記近位尿細管上皮細胞は、C D 1 0 の発現を特徴とする、
 - 前記遠位尿細管上皮細胞は、E P C A M の発現を特徴とする、
- 並びに、工程 b は前記細胞をリガンドのセットと接触させることにより達成され、前記セットは、C D 4、C D 8 及び C D 1 0 のいずれか、ポドカリキシン、ポドシン、ネフリン及び W T 1 のうちの 1 つ、かつ任意にサイトケラチン、C D 3 及び／又は E P C A M へ結合することが可能な構成要素を含み、前記構成要素のいずれかは、C D 3、C D 4、C D 8、ポドカリキシン、ポドシン、ネフリン、W T 1、C D 1 0、サイトケラチン及び E P C A M のうちの 1 つに特異的に結合することが可能である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 T 細胞の濃度、前記ポドサイトの濃度、前記近位尿細管上皮細胞の濃度、及び任意に前記遠位尿細管上皮細胞の濃度は、フローサイトメトリーによってそれぞれ測定される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

- c. 工程 b で測定される前記 T 細胞の濃度、前記ポドサイトの濃度、前記近位尿細管上皮細胞の濃度及び前記遠位尿細管上皮細胞の濃度から、ポドサイト／T 細胞の比率、ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率、ポドサイト／遠位尿細管上皮細胞の比率、T 細胞／近位尿細管上皮細胞の比率、及び／又は T 細胞／遠位尿細管上皮細胞の比率を測定する工程；
- d. 工程 c で測定される、前記ポドサイト／T 細胞の比率、前記ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率、前記 T 細胞／近位尿細管上皮細胞の比率、及び／又は前記 T 細胞／遠位尿細管上皮細胞の比率を閾値と比較する工程；
- e.

i. 前記ポドサイト／T 細胞の比率が、ポドサイト／T 細胞の閾値を下回る場合、及び／又は

i i. 前記ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率が、ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、及び／又は

i i i. 前記ポドサイト／遠位尿細管上皮細胞の比率が、ポドサイト／遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、及び／又は

i v. 前記 T 細胞／近位尿細管上皮細胞の比率が、T 細胞／近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、及び／又は

v. 前記 T 細胞／遠位尿細管上皮細胞の比率が、T 細胞／遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、

腎疾患を有する高い可能性、又は腎移植拒絶を受けている高い可能性を前記患者に割り当てる工程

をさらに含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

さらに前記 T 細胞の濃度が T 細胞の閾値を上回る事例において、腎移植拒絶を受けている

高い可能性を前記患者に割り当てる、
特に、

- 前記 T 細胞の閾値が、2000～500 個の T 細胞／100 ml の尿、特に1500～550 個の T 細胞／100 ml の尿、さらに特に1000～600 個の T 細胞／100 ml の尿、なおさらに特に約600 個の T 細胞／100 ml の尿である；
 - 前記ポドサイト／T 細胞の閾値が、0.01～0.3、特に0.02～0.2、さらに特に0.1～0.2、なおさらに特に約0.2 である；
 - 前記ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値が、1～13、特に1.5～10、さらに特に2～5、なおさらに特に約3 である；
 - 前記 T 細胞／近位尿細管上皮細胞の閾値が、約0.2 である；及び／又は
 - 前記 T 細胞／遠位尿細管上皮細胞の閾値が、約0.02 である、
- 請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 6】

さらに前記 T 細胞の濃度が T 細胞の閾値を上回る事例において、腎疾患を有する高い可能性を前記患者に割り当てる、

特に、

- 前記 T 細胞の閾値が、1500～200 個の T 細胞／100 ml の尿、特に1000～250 個の T 細胞／100 ml の尿、さらに特に800～300 個の T 細胞／100 ml の尿、なおさらに特に約400 個の T 細胞／100 ml の尿である；
 - 前記ポドサイト／T 細胞の閾値が、10～2、特に8～3、さらに特に6～4、なおさらに特に約5 である；
 - 前記ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値が、0.5～5、特に0.8～4、さらに特に1～3、なおさらに特に約1.5 である；
 - 前記ポドサイト／遠位尿細管上皮細胞の閾値が、0.5～5、特に0.8～4、さらに特に1～3、なおさらに特に約1.5 である；
 - 前記 T 細胞／近位尿細管上皮細胞の閾値が、0.05～1.0、特に0.1～0.8、さらに特に0.15～0.5、なおさらに特に約0.2 である；及び／又は
 - 前記 T 細胞／遠位尿細管上皮細胞の閾値が、0.05～1.0、特に0.1～0.8、さらに特に0.15～0.5、なおさらに特に約0.2 である、
- 請求項 4 に記載の方法。

20

30

【請求項 7】

0.02 を上回る、特に0.03 を上回る、T 細胞／遠位尿細管上皮細胞の比率が、ループス腎炎の指標である、請求項 4 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 T 細胞の濃度が、前記 T 細胞の閾値を上回り、かつ前記ポドサイト／T 細胞の比率が前記ポドサイト／T 細胞の閾値を下回る場合、急性細胞性移植拒絶の高い可能性を前記患者に割り当てる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 T 細胞の濃度が、前記 T 細胞の閾値を上回り、かつ前記ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率が、前記ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、急性体液性移植拒絶の高い可能性を前記患者に割り当てる、請求項 5～8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 10】

工程 b で測定される、前記 T 細胞の濃度、前記ポドサイトの濃度、前記近位尿細管上皮細胞の濃度及び／又は前記遠位尿細管上皮細胞の濃度を、それぞれの所定の細胞型の閾値とそれぞれ比較し、かつ少なくとも 2 つの前記濃度、特に少なくとも 3 つの前記濃度、さらに特に少なくとも 4 つの前記濃度、なおさらに特に全ての前記濃度が、前記それぞれの所定の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性、又は腎移植拒絶を受けている高い可能性を前記患者に割り当てる、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

50

C D 8 + T 細胞、C D 4 + T 細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞の総濃度を測定し、かつ前記総濃度が集団的細胞の濃度の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性又は腎移植拒絶を受けている高い可能性を前記患者に割り当てる、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記試料が、腎移植後 4 日目以降、特に腎移植後 5 日目以降に提供される、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

免疫抑制療法の増加へ腎移植患者を割り当てる方法であって、

－請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の方法によって、前記患者において移植拒絶の可能性を測定する工程；

－移植拒絶の高い可能性が測定される場合、免疫抑制療法の増加へ前記患者を割り当てる工程；

を含む、

特に、

a. 急性細胞性移植拒絶の高い可能性が測定される場合、急性細胞性移植拒絶に適した療法、特に高用量コルチゾンでの治療、免疫抑制薬の用量を増加した免疫抑制療法、T 細胞に対する治療用抗体での治療、抗胸腺細胞グロブリンでの治療及び抗 T N F を含む他の治療用抗体での治療を含む群から選択される療法に、患者を割り当てる；

b. 急性体液性移植拒絶の高い可能性が測定される場合、急性体液性移植拒絶に適した療法、特に高用量コルチゾンでの治療、血漿交換及びリツキシマブを含む B 細胞に対する治療用抗体での治療を含む群から選択される療法に、患者を割り当てる、

前記方法。

【請求項 1 4】

腎生検に腎移植患者を割り当てる方法であって、

－請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の方法によって、前記患者において移植拒絶の可能性を測定する工程；

－移植拒絶の高い可能性が測定される場合、腎生検に前記患者を割り当てる工程、

を含む、前記方法。

【請求項 1 5】

腎疾患を有する、又は腎移植拒絶を受けている患者の可能性を測定するキットであって、抗ポドカリキシン抗体、抗ポドシン抗体、抗ネフリン抗体及び抗 W T 1 抗体から選択される抗体、抗 C D 8 抗体及び／又は抗 C D 4 抗体、抗 C D 1 0 抗体、並びに任意に、抗 E P C A M 抗体及び／又は抗サイトケラチン抗体を含み、前記抗体は、蛍光によるフローサイトメトリーに適する、前記キット。

【請求項 1 6】

腎疾患を有する、又は腎移植拒絶を受けている患者の可能性を測定するための抗体の組み合わせの使用であって、前記抗体の組み合わせは、抗ポドカリキシン抗体、抗ポドシン抗体、抗ネフリン抗体及び抗 W T 1 抗体から選択される抗体、抗 C D 8 抗体及び／又は抗 C D 4 抗体、抗 C D 1 0 抗体、並びに任意に、抗 E P C A M 抗体及び／又は抗サイトケラチン抗体を含む、前記使用。

【請求項 1 7】

腎疾患を有する、又は腎移植拒絶を受けている患者の可能性を測定するためのシステムであって、

a. 被検体から得られる試料における細胞集団の頻度を測定するためのデバイス、及び

b. プログラムされたマイクロプロセッサであって、前記プログラムされたマイクロプロセッサは、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法を実行するように構成される、前記マイクロプロセッサ、

を含む、前記システム。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

本発明は尿試料におけるT細胞、ポドサイト（podocyte）、尿細管上皮細胞の濃度及びそれらの比率の解析による腎疾患及び腎移植拒絶の検出に関する。

【背景技術】

【0002】

説明

腎疾患は現在、糸球体濾過率の評価（クレアチニークリアランス）、血液尿関門の透過性の分析（タンパク尿）、及び尿中に存在する細胞の顕微鏡分析に基づいて主に診断されている。顕微鏡分析は、通常は染色されていない細胞の半定量的検出であり、検査官に大きく依存する。現在の非侵襲的方法は、高い感度と特異性を保証しない。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

腎臓移植は、末期腎不全の患者に最適な治療である。ただし、すべての移植には移植拒絶、基礎疾患の再発、又は慢性移植損傷のリスクがある。上記の方法のいずれかによって患者の移植機能の障害又は悪化が検出される場合、患者は通常、腎機能障害の基礎となる原因を明らかにするために腎生検を受ける必要がある。移植拒絶の場合、急性細胞性、急性体液性及び慢性体液性の移植拒絶に区別することができる。腎機能障害の基礎となる原因に応じて、適切な治療を決定することができる。

20

【課題を解決するための手段】

【0004】

上記の最新技術に基づいて、本発明の目的は、腎疾患を有する、又は移植拒絶を受けている患者の可能性を測定するための非侵襲的な方法を提供する。この目的は、本明細書の請求項によって達成される。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】図1はドットプロットにおける細胞型の定量のためのゲーティング戦略を示す。

（A）リンパ球ゲート、（B）DAPI⁻CD3⁺ゲート、（C）CD4⁺T細胞ゲート及びCD8⁺T細胞ゲート（D）サイトケラチン⁺ゲート、（E）EPCAM⁺尿細管上皮細胞ゲート及びCD10⁺尿細管上皮細胞ゲート、（F）ポドサイトゲート。B、C、D、E、及びFのデータは対数目盛（値の範囲は10⁰～10⁵）で表されるが、AのFSC軸は線形（値の範囲は50000～250000）である。

30

【図2】図2は、腎移植患者から得られた尿試料における、T細胞の濃度（CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞）（A）、ポドサイト対T細胞の比率（B）及びポドサイト対CD10⁺近位尿細管上皮細胞の比率（C）を示す。急性細胞性拒絶の群、急性体液性拒絶の群、慢性体液性拒絶の群及び拒絶なしの群は、腎生検により測定された。対照群は、移植後に安定した腎機能を有する患者である。

【図3ABC】図3は、直近の移植後、腎移植患者から得られた尿試料における、CD4⁺T細胞の濃度（A）、CD8⁺T細胞の濃度（B）、ポドサイトの濃度（C）、遠位尿細管上皮細胞の濃度（D）及び近位尿細管上皮細胞の濃度（E）を示す。X軸は腎移植された日を0日として、手術後の日数を示す。

40

【図3DE】図3は、直近の移植後、腎移植患者から得られた尿試料における、CD4⁺T細胞の濃度（A）、CD8⁺T細胞の濃度（B）、ポドサイトの濃度（C）、遠位尿細管上皮細胞の濃度（D）及び近位尿細管上皮細胞の濃度（E）を示す。X軸は腎移植された日を0日として、手術後の日数を示す。

【図4】図4は、活動性腎炎を伴う、又は伴わないSLE患者の尿における、100mLの尿当たりのT細胞数、並びにポドサイト、T細胞、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞（TEC）の比率を示す；有意性は、 $p < 0.05$ の場合*、及び $p < 0.01$ の場合**であり、スチューデントT検定で与えられる。

50

【図 5】図 5 は、活動性腎炎を伴う、又は伴わない A N C A 血管炎患者の尿における、100 mL の尿当たりの T 細胞数、並びにポドサイト、T 細胞、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞 (T E C) の比率を示す；有意性は、 $p < 0.05$ の場合*、及び $p < 0.01$ の場合**であり、マン・ホイットニー (Mann-Whitney) 検定で与えられる。

【発明を実施するための形態】

【0006】

用語と定義

本明細書の文脈における「急性拒絶」という用語は、手術後、早ければ5日で開始し得る拒絶の一形態に関する。該リスクは、移植後の最初の数ヵ月間で最も高いが、しかし急性拒絶は数年後にも発生することがある。

10

【0007】

本明細書の文脈における「急性細胞性拒絶」という用語は、移植片に侵入する T 細胞によって主に媒介される急性拒絶の一形態に関する。

【0008】

本明細書の文脈における「急性体液性拒絶」という用語は、移植片と交差反応する抗体により主に媒介される急性拒絶の一形態に関する。

【0009】

本明細書の文脈における「慢性拒絶」という用語は、急性拒絶より遅く発症する拒絶の一形態に関する。慢性拒絶は、急性拒絶の再発性の治療エピソードから発症することがある。慢性拒絶は治療に適しにくいと一般的に考えられている。

20

【0010】

本明細書の文脈における「慢性体液性拒絶」という用語は、移植片と交差反応する抗体によって媒介される慢性拒絶の一形態に関する。

【0011】

本明細書の文脈における「健康な被検体」という用語は、腎疾患と診断されていないヒトに関する。

【0012】

本明細書の文脈における「高用量コルチゾン」という用語は、体重 1 kg 当たり少なくとも 1 mg の一日当たりの成人コルチゾン用量、又は代替グルココルチコイドのそれぞれに対応する用量に関する。

30

【0013】

本明細書の文脈における「免疫療法の増加」という用語は、通常、高用量コルチゾン及び免疫細胞除去抗体 (immune cell depleting antibody) 又はサイトカイン阻害抗体からなる、付加的な免疫抑制療法の投与に関する。

【0014】

本明細書の文脈における「分子に特異的に結合するリガンド」という用語は、抗体及び抗体様分子に関する。

【0015】

本明細書の文脈における「抗体様分子」という用語は、他の分子又は標的に高親和性/ $K_d \leq 10 E^{-8} \text{ mol/L}$ で特異的に結合することができる分子を指す。抗体の特異的な結合と同様に、抗体様分子はその標的に結合する。抗体様分子という用語は、設計されたアンキリンリピートタンパク質 (Molecular Partners、チューリッヒ) などのリピートタンパク質、アルマジロリピートタンパク質に由来するポリペプチド、ロイシンリッチリピートタンパク質に由来するポリペプチド、及びテトラトリコペプチドリピートタンパク質に由来するポリペプチドを包含する。

40

【0016】

「抗体様分子」という用語は、蛋白質 A ドメインに由来するポリペプチド、フィブロネクチンドメイン FN3 に由来するポリペプチド、コンセンサスフィブロネクチンドメインに由来するポリペプチド、リボカリンに由来するポリペプチド、ジンクフィンガーに由来す

50

るポリペプチド、Srcホモロジドメイン2 (SH2) に由来するポリペプチド、Srcホモロジドメイン3 (SH3) に由来するポリペプチド、PDZドメインに由来するポリペプチド、ガンマークリスタリンに由来するポリペプチド、ユビキチンに由来するポリペプチド、システインノットポリペプチドに由来するポリペプチド、ノッチン、核酸アプタマー及びペプチドアプタマーに由来するポリペプチドを、さらに包含する。

【0017】

本明細書の文脈における「特異的に結合する」という用語は、ある分子が他の分子に解離定数 $K_d \leq 10 E^{-8} \text{ mol/L}$ で結合することに関する。

【0018】

本明細書において「陽性」という用語は、マーカーの発現という文脈で使用される場合、蛍光ラベル抗体によりアッセイされる抗原の発現を指し、同じ標的に特異的に結合しないアイソタイプが一致する抗体を用いて染色することとの比較における蛍光強度の中央値では、蛍光が少なくとも30%高い ($\geq 30\%$)、特に $\geq 50\%$ 又は $\geq 80\%$ である。そのようなマーカー発現は、マーカーの名前に続いて上付の文字「プラス」(+)、例えばCD4+により示される。

10

【0019】

本明細書では、「陰性」という用語は、マーカーの発現という文脈で使用される場合、蛍光ラベル抗体によりアッセイされる抗原の発現を指し、蛍光強度の中央値が、同じ標的に特異的に結合しないアイソタイプが一致する抗体の蛍光強度の中央値より、30%未満、特に15%未満である。そのようなマーカー発現は、マーカーの名前に続いて上付の文字「マイナス」(-)、例えばCD127-により示される。

20

【0020】

発明の概要

本発明の第1の態様によれば、腎疾患を有する、又は腎臓移植の拒絶を受けている可能性を有する患者を割り当てる方法が提供される。この方法は、

- a. 患者の尿試料を提供する工程；
- b. 尿試料中のT細胞の濃度、ポドサイトの濃度及び近位尿細管上皮細胞の濃度、並びに任意に遠位尿細管上皮細胞の濃度の測定する工程を含む。

【0021】

当業者であれば、工程aの後及び工程bの前に、細胞を尿試料から分離することを理解する。

30

【0022】

特定の実施形態では、T細胞はCD3及びCD4の発現を特徴とする。特定の実施形態では、T細胞はCD3及びCD8の発現を特徴とする。特定の実施形態では、T細胞はCD3、CD4及びCD8の発現を特徴とする。特定の実施形態では、T細胞はCD3の発現を特徴とする。特定の実施形態では、T細胞はCD4及びCD8の発現を特徴とする。

【0023】

特定の実施形態では、ポドサイトはポドカリキシンの発現を特徴とする。特定の実施形態では、ポドサイトはポドシンの発現を特徴とする。特定の実施形態では、ポドサイトはネフリンの発現を特徴とする。特定の実施形態では、ポドサイトはWT1の発現を特徴とする (ウィルムス腫瘍タンパク質1 (Wilms-Tumor-Protein 1))。

40

【0024】

特定の実施形態では、近位尿細管上皮細胞は、CD10の発現を特徴とする。特定の実施形態では、近位尿細管上皮細胞は、CD10及びサイトケラチンの発現を特徴とする。特定の実施形態では、遠位尿細管上皮細胞は、EPCAMの発現を特徴とする。特定の実施形態では、遠位尿細管上皮細胞は、EPCAM及びサイトケラチンの発現を特徴とする。

【0025】

工程bは、尿試料から分離される細胞を検出可能なりガンドのセットと接触させることにより行われる。該セットはCD4、CD8、CD10のいずれか、ポドカリキシン、ポド

50

シン、ネフリン及びWT1の少なくとも1つ、並びに任意にサイトケラチン、CD3及び／又はEPCAMに結合可能な構成要素を含む。いずれかの前記構成要素はCD3、CD4、CD8、ポドカリキシン、ポドシン、ネフリン、WT1、CD10、サイトケラチン及びEPCAMのうち1つに特異的に結合することができる。

【0026】

本明細書の文脈において、CD4はUniProt ID P01730を有するヒトタンパク質を指す。

【0027】

本明細書の文脈において、CD8はUniProt ID P01732を有するヒトタンパク質を指す。

10

【0028】

本明細書の文脈において、ポドシンはUniProt ID Q9NP85を有するヒトタンパク質を指す。

【0029】

本明細書の文脈において、WT1はUniProt ID P19544を有するヒトタンパク質を指す。

【0030】

本明細書の文脈において、ネフリンはUniProt ID O60500を有するヒトタンパク質を指す。

【0031】

20

本明細書の文脈において、ポドカリキシンはUniProt ID O00592を有するヒトタンパク質を指す。

【0032】

特定の実施形態では、リガンドは抗体である。

【0033】

特定の実施形態では、T細胞の濃度、ポドサイトの濃度、近位尿細管上皮細胞の濃度、及び任意に遠位尿細管上皮細胞の濃度は、それぞれフローサイトメトリーによって測定される。

【0034】

特定の実施形態では、腎疾患は、（腎）移植拒絶、急性腎不全、自己免疫疾患による急性腎不全、ループス腎炎、ANCA関連糸球体腎炎及び糖尿病性腎疾患を含む群から選択される。

30

【0035】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶である。

【0036】

特定の実施形態では、腎疾患は急性細胞性移植拒絶である。

【0037】

特定の実施形態では、腎疾患は急性体液性移植拒絶である。

【0038】

特定の実施形態では、腎疾患は慢性体液性移植拒絶である。

40

【0039】

特定の実施形態では、腎疾患は急性細胞性移植拒絶又は急性体液性移植拒絶である。

【0040】

特定の実施形態では、患者は尿試料の回収の前に腎機能障害の兆候を示した。特定の実施形態では、患者は蛋白尿又はクレアチニンクリアランスの減少／クレアチニンのレベルの増加を示した。

【0041】

特定の実施形態では、患者は尿試料の回収の前に、移植機能障害の兆候を示した。特定の実施形態では、患者は蛋白尿又はクレアチニンクリアランスの減少／クレアチニンのレベルの増加を示した。

50

【0042】

腎（又は腎移植）の機能障害の兆候が見られる患者は腎機能障害の基礎となる原因の解明のために腎生検に割り当てられることが多い。本発明の方法は不必要な腎生検の数を減らすことを可能にし、かつ腎生検を受ける必要がある患者の早期識別を容易にする。

【0043】

特定の実施形態では、該方法は

c. 工程bで測定される細胞の濃度から、ポドサイト／T細胞の比率とポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率を測定する工程；

d. 工程cで測定されるポドサイト／T細胞の比率及びポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率を各閾値と比較する工程；

e. i. ポドサイト／T細胞の比率が、ポドサイト／T細胞の閾値を下回る場合、若しくは

ii. ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率が、ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、腎疾患を有する、又は腎移植拒絶を受けている高い可能性を患者に割り当てる工程

をさらに含む。

【0044】

特定の実施形態では、該方法は

c. 工程bで測定される細胞の濃度から、ポドサイト／T細胞の比率及びポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率を測定する工程；

d. 工程bで測定されるT細胞の濃度及び工程cで測定されるポドサイト／T細胞の比率及びポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率をそれぞれの閾値と比較する工程；

e. i. T細胞の濃度がT細胞の閾値を上回り、かつポドサイト／T細胞の比率がポドサイト／T細胞の閾値を下回る場合、又は

ii. T細胞の濃度がT細胞の閾値を上回り、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率がポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性を患者に割り当てる工程

を含む。

【0045】

特定の実施形態では、該方法は

c. 工程bで測定される細胞の濃度から、ポドサイト／T細胞の比率及びポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率を測定する工程；

d. 工程bで測定されるT細胞の濃度及び工程cで測定されるポドサイト／T細胞の比率及びポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率をそれぞれの閾値と比較する工程；

e. i. T細胞の濃度が第1のT細胞の閾値を上回り、かつポドサイト／T細胞の比率がポドサイト／T細胞の閾値を下回る場合、又は

ii. T細胞の濃度が第2のT細胞の閾値を上回り、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率がポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合（ここで、第1のT細胞の閾値は第2のT細胞の閾値よりも高い）、

移植拒絶の高い可能性を患者に割り当てる工程

を含む。

【0046】

特定の実施形態では、上記の項（i）のパラメータは、急性細胞性拒絶の指標である。

【0047】

特定の実施形態では、上記の項（ii）のパラメータは、急性体液性拒絶の指標である。

【0048】

特定の実施形態では、T細胞の閾値は、健康な被験体の平均T細胞濃度を上回る。特定の実施形態では、T細胞の閾値は、健康な被験体の平均T細胞濃度より少なくとも10倍高い。特定の実施形態では、T細胞の閾値は、健康な被験体の平均T細胞濃度より少なくとも50倍高い。特定の実施形態では、T細胞の閾値は、健康な被験体の平均T細胞濃度よ

10

20

30

40

50

り少なくとも100倍高い。

【0049】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつT細胞閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均T細胞濃度を上回る。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつT細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均T細胞濃度より少なくとも2倍高い。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつT細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均T細胞濃度より少なくとも3倍高い。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつT細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均T細胞濃度より少なくとも5倍高い。

【0050】

当業者は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均的な濃度又は比率を参照して閾値を測定する事例を知っており、これは、患者からの試料が得られる時点から一致する時点で測定される平均濃度又は比率に関する。

【0051】

特定の実施形態では、T細胞の閾値は、2000～500のT細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、T細胞の閾値は、1500～550のT細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、T細胞の閾値は、1000～600のT細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、T細胞の閾値は、約600のT細胞/100mlの尿である。

【0052】

特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞の閾値は、1500～200のT細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞の閾値は、1000～250のT細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞の閾値は、800～300のT細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞の閾値は、約400のT細胞/100mlの尿である。

【0053】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつT細胞の閾値は、2000～500のT細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつT細胞の閾値は、1500～550のT細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつT細胞の閾値は、1000～600のT細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつT細胞の閾値は、約600のT細胞/100mlの尿である。

【0054】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト/T細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均ポドサイト/T細胞の比率を上回る。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト/T細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均ポドサイト/T細胞の比率より5倍以上(≧)を上回らない。

【0055】

特定の実施形態では、ポドサイト/T細胞の閾値は、0.01～0.3である。特定の実施形態では、ポドサイト/T細胞の閾値は、0.02～0.2である。特定の実施形態では、ポドサイト/T細胞の閾値は、0.1～0.2である。特定の実施形態では、ポドサイト/T細胞の閾値は、約0.1である。特定の実施形態では、ポドサイト/T細胞の閾値は、約0.2である。

【0056】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト/T細胞の閾値は、0.01～0.3である。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト/T細胞の閾値は、0.02～0.2である。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト/T細胞の閾値は、0.1～0.2である。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト/T細胞の閾値は、約0.1である。特定の実施

10

20

30

40

50

形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト／T細胞の閾値は、約0.2である。

【0057】

特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／T細胞の閾値は、10～2である。特定の実施形態では、ANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／T細胞の閾値は、8～3である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／T細胞の閾値は、6～4である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／T細胞の閾値は、約5である。

【0058】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率を上回る。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率より少なくとも2倍高い。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率より少なくとも3倍高い。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率より少なくとも5倍高い。

【0059】

特定の実施形態では、ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、1～13である。特定の実施形態では、ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、1.5～10である。特定の実施形態では、ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、2～5である。特定の実施形態では、ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、約3である。

【0060】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、1～13である。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、1.5～10である。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、2～5である。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、約3である。

【0061】

特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、0.5～5である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、0.8～4である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、1～3である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値は、約1.5である。

【0062】

特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／遠位尿細管上皮細胞の閾値は、0.5～5である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／遠位尿細管上皮細胞の閾値は、0.8～4である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／遠位尿細管上皮細胞の閾値は、1～3である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつポドサイト／遠位尿細管上皮細胞の閾値は、約1.5である。

【0063】

特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞／近位尿細管上皮細胞の閾値は、0.05～1.0である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞／近位尿細管上皮細胞の閾値は、0.1～0.8である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞／近位尿細管上皮細胞の閾値は

、0.15～0.5である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞／近位尿細管上皮細胞の閾値は、約0.2である。

【0064】

特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞／遠位尿細管上皮細胞の閾値は、0.05～1.0である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞／遠位尿細管上皮細胞の閾値は、0.1～0.8である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞／遠位尿細管上皮細胞の閾値は、0.15～0.5である。特定の実施形態では、腎疾患はANCA関連腎炎であり、かつT細胞／遠位尿細管上皮細胞の閾値は、約0.2である。

【0065】

特定の実施形態では、T細胞の濃度がT細胞の閾値を上回り、かつポドサイト／T細胞の比率がポドサイト／T細胞の閾値を下回る場合、急性細胞性移植拒絶の高い可能性が、患者に割り当てられる。

【0066】

特定の実施形態では、T細胞濃度が、T細胞の濃度がT細胞の閾値を上回り、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率がポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、急性体液性移植拒絶の高い可能性が、患者に割り当てられる。

【0067】

特定の実施形態では、ポドサイト／T細胞の比率がポドサイト／T細胞の閾値を下回る場合、急性細胞性移植拒絶の高い可能性が、患者に割り当てられる。

【0068】

特定の実施形態では、ポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率がポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、急性体液性移植拒絶の高い可能性が、患者に割り当てられる。

【0069】

特定の実施形態では、T細胞の濃度が第1のT細胞の閾値を上回り、かつポドサイト／T細胞の比率がポドサイト／T細胞の閾値を下回る場合、急性細胞性移植拒絶の高い可能性が、患者に割り当てられる。特定の実施形態では、T細胞の濃度が第2のT細胞の閾値を上回り、かつポドサイト／近位尿細管上皮細胞の比率がポドサイト／近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合は、急性体液性移植拒絶の高い可能性が、患者に割り当てられる。第1のT細胞及び第2のT細胞の閾値が使用される事例では、第1のT細胞の閾値は、第2のT細胞の閾値より高い。

【0070】

特定の実施形態では、T細胞／遠位尿細管上皮細胞の比率は、0.02を上回り、特に0.03を上回ると、ループス腎炎であることを示す。

【0071】

患者にもたらされる治療のために、移植拒絶の様々な形態の間の差異は重要である。急性細胞性移植拒絶に適している治療は、高用量コルチゾン、免疫抑制薬の用量を増加する免疫抑制療法、T細胞に対する治療用抗体、抗胸腺細胞グロブリン、サイモグロブリン、アトガム（Atgam）（登録商標）及び抗TNFを含む他の治療用抗体を含む。急性体液性移植拒絶に適している治療は、高用量コルチゾン、血漿交換、リツキシマブ（Rituximab）を含むB細胞に対する治療用抗体を含む。

【0072】

特定の実施形態では、工程bで測定される、T細胞の濃度、ポドサイトの濃度、近位尿細管上皮細胞の濃度及び／又は遠位尿細管上皮細胞の濃度の濃度を、それぞれの所定の細胞型の閾値と比較し、そして、少なくとも2つの濃度、特に少なくとも3つの濃度、さらに特に少なくとも4つの濃度、なおさらに特に前記全ての濃度が、前記それぞれの所定の閾値を上回る場合、腎疾患を有する又は腎移植拒絶を受けている高い可能性が、患者に割り当てられる。特定の実施形態では、総CD4＋CD8＋T細胞濃度の代わりに、CD4＋T細胞の濃度及びCD8＋T細胞濃度を測定し、かつ所定のCD4＋T細胞の閾値又は所

10

20

30

40

50

定のCD8+T細胞の閾値とそれぞれ比較する。

【0073】

特定の実施形態では、少なくとも2つの濃度がそれぞれの細胞型の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が、患者に割り当てられる。特定の実施形態では、少なくとも3つの濃度がそれぞれの細胞型の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が患者に割り当てられる。特定の実施形態では、少なくとも4つの濃度がそれぞれの細胞型の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が患者に割り当てられる。特定の実施形態では、全ての濃度がそれぞれの細胞型の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が患者に割り当てられる。

【0074】

特定の実施形態では、T細胞の濃度、特にCD8+T細胞の濃度が、それぞれの細胞型の閾値（それぞれのT細胞の閾値又はCD8+T細胞の閾値）を上回り、ポドサイトの濃度が、ポドサイトの閾値を上回り、近位尿細管上皮細胞の濃度が、近位尿細管上皮細胞の閾値を上回り、かつ遠位尿細管上皮細胞の濃度が、遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が、患者に割り当てられる。

【0075】

特定の実施形態では、T細胞の濃度、特にCD8+T細胞の濃度が、それぞれの細胞型の閾値（それぞれのT細胞の閾値又はCD8+T細胞の閾値）を上回り、ポドサイトの濃度が、ポドサイトの閾値を上回り、かつ近位尿細管上皮細胞の濃度が、近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が患者に割り当てられる。

【0076】

特定の実施形態では、T細胞の濃度、特にCD8+T細胞の濃度が、それぞれの細胞型の閾値（それぞれのT細胞の閾値又はCD8+T細胞の閾値）を上回り、ポドサイトの濃度が、ポドサイトの閾値を上回り、かつ遠位尿細管上皮細胞の濃度が、遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が、患者に割り当てられる。

【0077】

特定の実施形態では、T細胞の濃度、特にCD8+T細胞の濃度が、それぞれの細胞型の閾値（それぞれのT細胞の閾値又はCD8+T細胞の閾値）を上回り、かつポドサイトの濃度が、ポドサイトの閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が、患者に割り当てられる。

【0078】

特定の実施形態では、ポドサイトの濃度が、ポドサイトの閾値を上回り、近位尿細管上皮細胞の濃度が、近位尿細管上皮細胞の閾値を上回り、かつ遠位尿細管上皮細胞の濃度が、遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が、患者に割り当てられる。

【0079】

特定の実施形態では、ポドサイトの濃度がポドサイトの閾値を上回り、かつ近位尿細管上皮細胞の濃度が近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が、患者に割り当てられる。

【0080】

特定の実施形態では、ポドサイトの濃度がポドサイトの閾値を上回り、かつ遠位尿細管上皮細胞の濃度が遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が、患者に割り当てられる。

【0081】

特定の実施形態では、CD8+T細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞の総濃度が集団的細胞の濃度の閾値を上回る場合、腎疾患を有する高い可能性が患者に割り当てられる。

【0082】

特定の実施形態では、少なくとも2つの濃度がそれぞれの細胞型の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。特定の実施形態では、少なくとも3つの濃

10

20

30

40

50

度がそれぞれの細胞型の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。特定の実施形態では、少なくとも4つの濃度がそれぞれの細胞型の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。特定の実施形態では、全ての濃度がそれぞれの細胞型の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

【0083】

特定の実施形態では、T細胞の濃度、特にCD8+T細胞の濃度が、それぞれの細胞型の閾値（それぞれのT細胞の閾値又はCD8+T細胞の閾値）を上回り、ポドサイトの濃度が、ポドサイトの閾値を上回り、近位尿細管上皮細胞の濃度が、近位尿細管上皮細胞の閾値を上回り、かつ遠位尿細管上皮細胞の濃度が、遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

10

【0084】

特定の実施形態では、T細胞の濃度、特にCD8+T細胞の濃度が、それぞれの細胞型の閾値（それぞれのT細胞の閾値又はCD8+T細胞の閾値）を上回り、ポドサイトの濃度が、ポドサイトの閾値を上回り、かつ近位尿細管上皮細胞の濃度が、近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

【0085】

特定の実施形態では、T細胞の濃度、特にCD8+T細胞の濃度が、それぞれの細胞型の閾値（それぞれのT細胞の閾値又はCD8+T細胞の閾値）を上回り、ポドサイトの濃度が、ポドサイトの閾値を上回り、かつ遠位尿細管上皮細胞の濃度が、遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

20

【0086】

特定の実施形態では、T細胞の濃度、特にCD8+T細胞の濃度が、それぞれの細胞型の閾値（それぞれのT細胞の閾値又はCD8+T細胞の閾値）を上回り、かつポドサイトの濃度が、ポドサイトの閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

【0087】

特定の実施形態では、ポドサイトの濃度が、ポドサイトの閾値を上回り、近位尿細管上皮細胞の濃度が、近位尿細管上皮細胞の閾値を上回り、かつ遠位尿細管上皮細胞の濃度が、遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

30

【0088】

特定の実施形態では、ポドサイトの濃度がポドサイトの閾値を上回り、かつ近位尿細管上皮細胞の濃度が近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

【0089】

特定の実施形態では、ポドサイトの濃度がポドサイトの閾値を上回り、かつ遠位尿細管上皮細胞の濃度が遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

【0090】

特定の実施形態では、CD8+T細胞、CD4+T細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞の総濃度が測定され、かつ総濃度が集団的細胞の濃度の閾値を上回る場合、腎疾患を有する、又は腎移植拒絶を受けている高い可能性が患者に割り当てられる。

40

【0091】

特定の実施形態では、T細胞の閾値は、健康な被験体の平均T細胞濃度を上回る。特定の実施形態では、T細胞の閾値は、健康な被験体の平均T細胞濃度より少なくとも100倍高い。

【0092】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつT細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均T細胞濃度を上回る。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であ

50

り、かつT細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均T細胞濃度より少なくとも3倍高い。

【0093】

特定の実施形態では、CD4+T細胞の閾値は、健康な被験体の平均CD4+T細胞の濃度を上回る。特定の実施形態では、CD4+T細胞の閾値は、健康な被験体の平均CD4+T細胞の濃度より少なくとも50倍高い。

【0094】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつCD4+T細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均CD4+T細胞の濃度を上回る。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつCD4+T細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均CD4+T細胞の濃度より少なくとも3倍高い。

10

【0095】

特定の実施形態では、CD8+T細胞の閾値は、健康な被験体の平均CD8+T細胞の濃度を上回る。特定の実施形態では、CD8+T細胞の閾値は、健康な被験体の平均CD8+T細胞の濃度より少なくとも50倍高い。

【0096】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつCD8+T細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均CD8+T細胞濃度を上回る。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつCD8+T細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均CD8+T細胞の濃度より少なくとも3倍高い。

20

【0097】

特定の実施形態では、ポドサイトの閾値は、健康な被験体の平均ポドサイトの濃度を上回る。特定の実施形態では、ポドサイトの閾値は、健康な被験体の平均ポドサイトの濃度より少なくとも5倍高い。

【0098】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイトの閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均ポドサイトの濃度を上回る。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつポドサイトの閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均ポドサイトの濃度より少なくとも5倍高い。

【0099】

特定の実施形態では、近位尿細管上皮細胞の閾値は、健康な被験体の平均近位尿細管上皮細胞の濃度を上回る。特定の実施形態では、近位尿細管上皮細胞の閾値は、健康な被験体の平均近位尿細管上皮細胞の濃度より少なくとも5倍高い。

30

【0100】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつ近位尿細管上皮細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均近位尿細管上皮細胞の閾値を上回る。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつ近位尿細管上皮細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均近位尿細管上皮細胞の濃度より少なくとも5倍高い。

【0101】

特定の実施形態では、遠位尿細管上皮細胞の閾値は、健康な被験体の平均遠位尿細管上皮細胞の濃度を上回る。特定の実施形態では、遠位尿細管上皮細胞の閾値は、健康な被験体の平均遠位尿細管上皮細胞の濃度より少なくとも5倍高い。

40

【0102】

特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつ遠位尿細管上皮細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均遠位尿細管上皮細胞の閾値を上回る。特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶であり、かつ遠位尿細管上皮細胞の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者の平均遠位尿細管上皮細胞の濃度より少なくとも5倍高い。

【0103】

特定の実施形態では、集合的細胞の濃度の閾値は、健康な被検体における、CD8+T細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞の平均総濃度を上回る。特

50

定の実施形態では、集合的細胞の濃度の閾値は、健康な被検体における、CD8+T細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞の平均総濃度より少なくとも5倍高い。

【0104】

特定の実施形態では、集合的細胞の濃度の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者における、CD8+T細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞の平均総濃度を上回る。特定の実施形態では、集合的細胞の濃度の閾値は、腎移植後に合併症を示さない患者における、CD8+T細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞の平均総濃度より少なくとも5倍高い。

【0105】

特定の実施形態では、集合的細胞の濃度の閾値は、20.000~200.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、集合的細胞の濃度の閾値は、22.000~100.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、集合的細胞の濃度の閾値は、23.000~50.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、集合的細胞の濃度の閾値は、24.000~30.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、集合的細胞の濃度の閾値は、約45.000の細胞/100mlの尿である。

【0106】

特定の実施形態では、疾患は移植拒絶であり、かつ集合的細胞の濃度の閾値は、20.000~200.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、疾患は移植拒絶であり、かつ集合的細胞の濃度の閾値は、22.000~100.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、疾患は移植拒絶であり、かつ集合的細胞の濃度の閾値は、23.000~50.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、疾患は移植拒絶であり、かつ集合的細胞の濃度の閾値は、24.000~30.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、疾患は移植拒絶であり、かつ集合的細胞の濃度の閾値は、約45.000の細胞/100mlの尿である。

【0107】

特定の実施形態では、疾患は移植拒絶であり、かつ移植後5日目における集合的細胞の濃度の閾値は、20.000~200.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、疾患は移植拒絶であり、かつ移植後5日目における集合的細胞の濃度の閾値は、22.000~100.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、疾患は移植拒絶であり、かつ移植後5日目における集合的細胞の濃度の閾値は、23.000~50.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、疾患は移植拒絶であり、かつ移植後5日目における集合的細胞の濃度の閾値は、24.000~30.000の細胞/100mlの尿である。特定の実施形態では、疾患は移植拒絶であり、かつ移植後5日目における集合的細胞の濃度の閾値は、約45.000の細胞/100mlの尿である。

【0108】

本発明の方法は、移植拒絶の高い可能性を有する患者の識別を可能にする。本発明の方法に記載の移植拒絶の高い可能性を示す患者は、特別な検査に割り当てられる必要がある。この検査から示される結果によって、各閾値を上回る細胞濃度を示す患者は、腎生検に割り当てられる必要がある。本発明の方法は不必要な腎生検の数を減らすことを可能にし、かつ腎生検を受ける必要がある患者の早期識別を容易にする。

【0109】

特定の実施形態では、移植の後4日目以降に試料が提供される。特定の実施形態では、移植の後5日目以降に試料が提供される。特定の実施形態では、移植の後5日目~数年間に試料が提供される。特定の実施形態では、移植の後5日目~10日目に試料が提供される。特定の実施形態では、移植の後5日目~7日目に試料が提供される。特定の実施形態では、移植の後5日目に試料が提供される。

【0110】

特定の実施形態では、2つ（又はそれ以上）の試料が提供され、

－第1の試料は移植後5日目以前に提供され、かつ第2の試料は移植後5日目以降に提供され、並びに

－i. 第1の試料において少なくとも2つの前記濃度、特に少なくとも3つの前記濃度、さらに特に少なくとも4つの前記濃度、なおさらに特に全ての前記濃度が、第1の各細胞型の閾値を下回り、かつ

i i. 第2の試料において少なくとも2つの前記濃度、特に少なくとも3つの前記濃度、さらに特に少なくとも4つの前記濃度、なおさらに特に全ての前記濃度が、第2の各細胞型の閾値を上回る場合、

移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

10

【0111】

特定の実施形態では、5つの関連する細胞型のサブセット（CD8＋T細胞、CD4＋T細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞、遠位尿細管上皮細胞）のみ比較される事例において、同じ細胞型は、第1の試料及び第2の試料において比較される。

【0112】

特定の実施形態では、第1の試料においてT細胞の濃度、特にCD4＋T細胞の濃度が所定のT細胞の閾値を下回り、かつ第2の試料において、少なくとも2つの前記濃度、特に少なくとも3つの前記濃度、さらに特に少なくとも4つの前記濃度、なおさらに特に全ての前記濃度が各細胞型の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

20

【0113】

特定の実施形態では、第1の試料においてT細胞の濃度、特にCD4＋T細胞の濃度が所定のT細胞の閾値を下回り、かつ第2の試料において、CD8＋T細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞の総濃度が集合的細胞の濃度の閾値を上回る場合、移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

【0114】

特定の実施形態では、2つ（又はそれ以上）の試料が提供され、

－第1の試料は移植後5日目以前に提供され、かつ第2の試料は移植後5日目以降に提供され、並びに

－i. 第1の試料において、CD8＋T細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞の総濃度が集合的細胞の濃度の閾値を上回り、かつ

30

i i. 第2の試料において、CD8＋T細胞、ポドサイト、近位尿細管上皮細胞及び遠位尿細管上皮細胞の総濃度が集合的細胞の濃度の閾値を上回る場合、

移植拒絶の高い可能性が患者に割り当てられる。

【0115】

あるいは、本発明の第1の態様は、移植拒絶を現在受けている可能性を腎臓移植患者に割り当てる方法として記載することができる。

【0116】

あるいは、本発明の第1の態様は、移植拒絶のリスクにある可能性を腎臓移植患者に割り当てる方法として記載することができる。この本発明の第1の態様の代替的記述において、尿試料は移植後の拒絶の可能性を予測するために、手術前に採取されてもよい。

40

【0117】

本発明の第2の態様によれば、免疫抑制療法の増加へ腎臓移植患者を割り当てるための方法が提供される。該方法は、

－上記の請求項のいずれか一項に記載の方法によって、前記患者において移植拒絶の可能性を測定する工程；

－移植拒絶の高い可能性が測定される場合、免疫抑制療法の増加へ前記患者を割り当てる工程

を含む。

【0118】

50

本発明のこの態様の特定の実施形態では、本発明の第1の態様の各実施形態により、急性細胞性移植拒絶の高い可能性が患者へ割り当てられる場合、患者は急性細胞性移植拒絶に適切な治療へ割り当てられる。本発明のこの態様の特定の実施形態では、患者は、高用量コルチゾンでの治療、免疫抑制薬の用量を増加した免疫抑制療法、T細胞に対する治療抗体での治療、抗胸腺細胞グロブリンでの治療及び抗TNFを含む他の治療用抗体での治療を含む群から選択される療法に割り当てられる。

【0119】

本発明のこの態様の特定の実施形態では、本発明の第1の態様の各実施形態により、急性体液性移植拒絶の高い可能性が患者へ割り当てられた場合、患者は急性体液性移植拒絶に適切な治療へ割り当てられる。本発明のこの態様の特定の実施形態では、患者は、高用量コルチゾンでの治療、血漿交換及びリツキシマブを含むB細胞に対する治療用抗体による治療を含む群から選択される療法に割り当てられる。

10

【0120】

本発明の別の態様によれば、腎臓移植患者を腎生検に割り当てる方法が提供される。該方法は、

—上記の請求項のいずれか一項に記載の方法によって、前記患者において移植拒絶の可能性を測定する工程、

—移植拒絶の高い可能性が測定される場合、前記患者を腎生検に割り当てる工程を含む。

【0121】

本発明の別の態様によれば、腎疾患を有する、又は腎移植拒絶を受けている患者の可能性を測定するためのパーツのキットが提供される。言い換えれば、腎疾患又は移植拒絶を診断するためのキットが提供される。このキットは、抗ポドカリキシン抗体、抗ポドシン抗体、抗ネフリン抗体及び抗WT1抗体から選択される抗体、抗CD8抗体及び／又は抗CD4抗体、抗CD10抗体、及び任意に、抗EPCAM抗体及び／又は抗サイトケラチン抗体を含む。該抗体は蛍光によるフローサイトメトリーに適している。

20

【0122】

本発明のこの態様の特定の実施形態では、キットは抗CD8抗体及び／又は抗CD4抗体、抗ポドカリキシン抗体及び抗CD10抗体を含む。本発明のこの態様の特定の実施形態では、キットは抗CD8抗体、抗CD4抗体、抗ポドカリキシン抗体及び抗CD10抗体を含む。本発明のこの態様の特定の実施形態では、キットは抗CD8及び／又は抗CD4抗体、抗ポドカリキシン抗体、抗CD10抗体及び抗EPCAM及び／又は抗サイトケラチン抗体を含む。本発明のこの態様の特定の実施形態では、キットは抗CD8抗体、抗CD4抗体、抗ポドカリキシン抗体、抗CD10抗体及び抗EPCAM及び／又は抗サイトケラチン抗体を含む。本発明のこの態様の特定の実施形態では、キットは抗CD8抗体、抗CD4抗体、抗ポドカリキシン抗体、抗CD10抗体、抗EPCAM及び抗サイトケラチン抗体を含む。

30

【0123】

本発明のさらに別の態様によれば、腎疾患を有する、又は腎移植拒絶を受けている患者の可能性を測定するための抗体の組み合わせの使用が提供される。抗体の組み合わせは、抗ポドカリキシン抗体、抗ポドシン抗体、抗ネフリン抗体及び抗WT1抗体から選択される抗体、抗CD8抗体及び／又は抗CD4抗体、抗CD10抗体、及び任意に、抗EPCAM抗体及び／又は抗サイトケラチン抗体を含む。

40

【0124】

本発明のさらに別の態様によれば、腎疾患を有する、又は腎移植拒絶を受けている患者の可能性を測定するためのシステムが提供される。システムは、被験体から得られる試料中の細胞集団の頻度を測定するためのデバイス及びプログラムされたマイクロプロセッサを含む。プログラムされたマイクロプロセッサは、上記の請求項のいずれか一項に記載の方法を実行するように構成される。

【0125】

50

本発明のいずれかの態様の特定の実施形態では、腎疾患は移植拒絶である。本発明のいずれかの態様の特定の実施形態では、腎疾患は急性細胞性拒絶又は急性体液性拒絶である。本発明のいずれかの態様の特定の実施形態では、腎疾患は急性細胞性拒絶である。本発明のいずれかの態様の特定の実施形態では、腎疾患は急性体液性拒絶である。

【0126】

本発明は、以下の実施例及び図によってさらに説明され、そこからさらなる実施形態及び利点を引き出すことができる。これらの実施例は、本発明を説明することを意図しているが、その範囲を限定することは意図していない。

【実施例】

【0127】

1. 方法

試料の回収

腎移植患者を受けた患者からの尿試料をカテーテルにより、又は自身で回収した。試料は、回収の6時間以内に分析するために、滅菌ビーカー内に保持し調整した。

【0128】

細胞の分離

試料を50mlチューブに分注し、4℃、1300gで8分間遠心分離した。上清を捨て、沈殿物を再懸濁し、そしてPBS/BSA緩衝液に混合し、試料につき40mlを得た。非固定細胞(T細胞)の分析は、試料の回収日に実施した。固定細胞の分析は、試料の回収から7日以内に実施した。

【0129】

固定細胞：細胞内マーカーを染色するために、10mlの分離された細胞を15mlのチューブに移し、4℃、1300gで8分間遠心分離した。上清を捨て、そして沈殿物をPBS/BSA緩衝液に再懸濁した。溶液を1.5mlのチューブに移し、4℃、2300gで8分間遠心分離した。上清を捨てた。沈殿物を100μlのPBS/BSA緩衝液及び100μlの4%PFAに再懸濁し、室温で15分間インキュベートした。次に、1mlのPBSを加え、そして試料を4℃、2300gで8分間遠心分離した。上清を捨て、そして沈殿物を20μlのPBSA-BSA-酸性溶液に再懸濁し一晚保存するか、又は細胞内染色のため穿孔に供するかした。

【0130】

非固定細胞：残りの30mlの分離細胞を15mlのサッカロースーエピクロルヒドリン-コポリマー(saccharose-epichlorhydrin-copolymer)にゆっくりとピペッティングし、遠心分離(20℃、2000gで20分間)により単核細胞を分離した。単核細胞は白い細胞層として見ることができ、そしてピペットを使用して15mlチューブに移すことができる。次に、細胞を4℃、1300gで8分間遠心分離した。沈殿物を1800μlのPBS/BSA緩衝液に再懸濁し、2つの1.5mlチューブに分注し、4℃、1300gで8分間遠心分離した。次に細胞に染色を施した。

【0131】

染色

次の細胞外マーカーを使用した：CD3、CD4、CD8、CD10、EPCAM及びポドカリキシン。T細胞を識別するためにCD3、CD4及びCD8を使用した。上皮細胞を識別するために、固定細胞の細胞内サイトケラチン染色を使用した。近位尿細管上皮細胞を識別するためにサイトケラチン及びCD10を使用した。遠位尿細管上皮細胞を識別するために、サイトケラチン及びEPCAMを使用した。ポドサイトを識別するために、ポドカリキシンを使用した。ポドカリキシンはシアロ糖タンパク質であり、かつポドサイトのグリコカリックス(タンパク質又は脂質に結合した細胞外炭水化物)の主成分である。非固定細胞内の生細胞と死細胞を区別するために、4',6-ジアミジノー2-フェニルインドール(DAPI)を使用した。フローサイトメトリーの前に、それを直ちに試料に加えた。CD3、CD4、CD8、CD10、EPCAM、ポドカリキシン及びサイト

10

20

30

40

50

ケラチンに対する抗体は、蛍光色素 V i o Green、F I T C、P E、P e r C P、P E - V i o 7 7 0、C y 5 及び A P C - V i o 7 7 0 へ対にして結合された。色素の発光スペクトルを明確に区別することができ、マーカーの分離が可能となる。M A C S Q u a n t A n a l y z e r 1 0 フローサイトメーターの 3 つのレーザーによって、すべての色素を励起できる。

【0132】

染色する前に、すべての試料を 9 0 μ l の P B S / B S A 緩衝液（細胞外染色）又は 9 0 μ l のサポニン（細胞内染色）及び 1 0 μ l のフレボガンマに再懸濁した。フレボガンマは、非特異的な F c 受容体を阻害する。続いて抗体を加えた。試料を 4 $^{\circ}$ C で 1 5 分間、暗所でインキュベートした。試料を 1 m l の P B S / B S A 緩衝液（細胞外染色）又はサポニン（細胞内染色）を使用して洗浄し、そして 4 $^{\circ}$ C、2 3 0 0 g で 8 分遠心分離した。沈殿物は 1 8 0 μ l（パネル 1）又は 1 2 0 μ l（パネル 2 及び 3）に再懸濁した。パネル 2 及び 3 における抗体で染色された試料は、フローサイトメトリーの前に「セルストレーナ 7 0 μ m ナイロン」（コーニング社）を使用して濾過した。表 1 は、本実験で使用した抗体を一覧にする。

【0133】

【表 1】

パネル 1 : T 細胞	パネル 2 : ポドサイト	パネル 3 : 尿細管上皮細胞	チャンネル
DAPI			V1-Vio Blue-DAPI
		サイトケラチン FITC ミルテニー社 130-080-101 1:10 =10 µl /100 µl 上皮細胞	B1-FITC
	ポドカリキシン-PE REA246 ミルテニー社 130-101-410 1:10 =10 µl / 100 µl ポドサイト		B2-PE
CD3 PerCP ミルテニー社 130-094-965 1:10 = 10 µl / 100 µl T 細胞			B3-PerCP-PI
CD4-PE-Vio770 ミルテニー社 130-096-552 1:10 = 10 µl / 100 µl T 細胞		CD10-PE-Vio770 ミルテニー社 130-100-421 1:10 =10 µl / 100 µl 近位尿細管上皮細胞	Panel 1
CD8-APC-Vio770 ミルテニー社 130-096-561 10 µl / 100 µl T 細胞		EPCAM APC-VIO 770 ミルテニー社 130-101-161 1:10 = 10 µl / 100 µl 遠位尿細管上皮細胞	R2-APC Vio 770

10

20

30

40

【0134】

フローサイトメトリー

試料をフローサイトメトリーにより分析し定量した。MACSQuant Analyzer 10 フローサイトメーターを使用した。図 1 は、試料のフローサイトメトリー分析の典型的な例を示す。

50

【0135】

2. 患者コホート

腎移植患者の縦断コホート及び横断コホートを分析した。

【0136】

横断コホート

横断コホートは、腎機能障害（クレアチニンレベル及び／又はタンパク尿の増加）の兆候を示した後に移植物の生検を受けた19人の患者で構成される。生検の結果に応じて、患者は、急性細胞性拒絶の群、急性体液性拒絶の群、慢性体液性拒絶の群又は拒絶なしの群に割り当てられた。群は、腎移植後の時間に関して不均一（heterogeneous）である。生検の3日以内に患者を分析した。除外基準は、免疫抑制療法の増加と肉眼的血尿であった。対照群は、腎生検を受けていない安定した移植機能を有する9人の患者で構成される。表2は、横断コホートにおける患者の特性を一覧にする。年齢は中央値として与えられる；年齢の範囲を括弧内に示す。

10

【0137】

【表2】

	急性細胞性拒絶	急性体液性拒絶	慢性体液性拒絶	拒絶なし	対照
n	4	3	4	8	9
性別	男性4／女性0	男性2／女性1	男性3／女性1	男性6／女性2	男性7／女性2
年齢	65 (49－79)	72 (49－73)	51 (27－74)	58 (32－79)	50 (39－83)

20

【0138】

縦断コホート

縦断コホートは、腎移植直後の23人の患者で構成される。患者を「合併症あり」と「合併症なし」の群に分けた。「合併症あり」の群は、移植片機能の遅延、拒絶及び外科的合併症を含むいくつかの合併症を含む。表3は、縦断コホートにおける患者の特性を一覧にする。年齢は中央値として与えられる；年齢の範囲を括弧内に示す。

30

【0139】

【表3A】

	新鮮移植
n	24
性別	男性17／女性7
年齢	51 (22－77)

40

SLEコホート

全身性エリテマトーデス（SLE）を有する患者のコホートを分析した。活動性増殖性腎炎を有する、又は有さない患者を比較した。

【表 3 B】

患者	年齢	男性／女性	SLE疾患活動性指数 (SLEDAI)	腎SLE疾患活動性指数 (rSLEDAI)	増殖性 ループス腎炎
1	78	女性	0	0	無
2	38	女性	0	0	無
3	26	女性	5	0	無
4	40	女性	12	8	無
5	28	女性	10	8	有
6	39	男性	12	8	有
7	29	男性	14	8	有
8	50	女性	18	10	有
9	34	女性	12	8	有

10

20

【0140】

ANCAコホート

ANCA血管炎と診断された患者のコホートを分析した。活動性増殖性腎炎を有する、又は有さない患者を比較した。

【0141】

30

【表 4】

仮名	腎炎	男性／女性	年齢	臨床診断
1 2 8 1	有	女性	7 4	G P A
1 8 7 7	有	男性	5 5	M P A + 膜形成性の G N
1 8 7 7	有	男性	5 5	M P A + 膜形成性の G N
1 8 8 1	有	男性	8 3	G P A ?
1 8 8 2	有	男性	6 8	G P A
1 8 8 3	有	女性	6 0	G P A
1 8 8 5	有	男性	3 5	G P A
1 8 8 6	有	女性	5 8	G P A
1 8 7 6	無	男性	3 3	G P A
1 8 7 8	無	女性	6 4	G P A
1 8 7 9	無	男性	5 6	G P A
1 8 8 0	無	女性	4 0	G P A 再発

10

20

G P A = 多発血管炎を伴う肉芽腫症、G N = 糸球体腎炎、M P A = 顕微鏡的多発血管炎
【0 1 4 2】

30

3. 結果

横断コホート

T細胞の濃度（図 2 A）、ポドサイトとT細胞の比率（図 2 B）、及びポドサイトと近位尿細管上皮細胞の比率（図 2 C）のパラメータの組み合わせにより、異なる群へ患者をマッピングすることが可能となった。ポドサイトとT細胞の比率は、急性細胞性拒絶を受けている患者の識別を可能にした。ポドサイトとT細胞の比率及びT細胞の濃度の組み合わせは、100%の感度及び100%の特異性を有する急性細胞性拒絶を受けている患者の識別を可能にした。ポドサイトと近位尿細管上皮細胞の比率は急性体液性拒絶を受けている患者の識別を可能にした。ポドサイトと近位尿細管上皮細胞の比率及びT細胞の濃度の組み合わせは、100%の感度及び96, 2%の特異性を有する急性体液性拒絶を受けている患者の識別を可能にした。

40

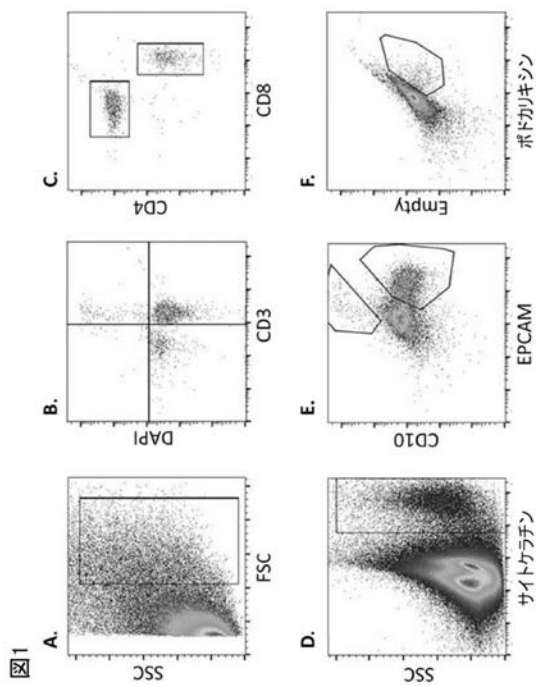
【0 1 4 3】

縦断コホート

最初は、より多くの免疫系及び上皮細胞が、「合併症なし」の群の試料において検出された。時間とともに、関係が変化し、より多くのC D 4 + 及びC D 8 + 細胞、マクロファージ、ポドサイト、近位及び遠位尿細管上皮細胞が、「合併症あり」の群の試料において検出された（すべて $p < 0.05$ ）。

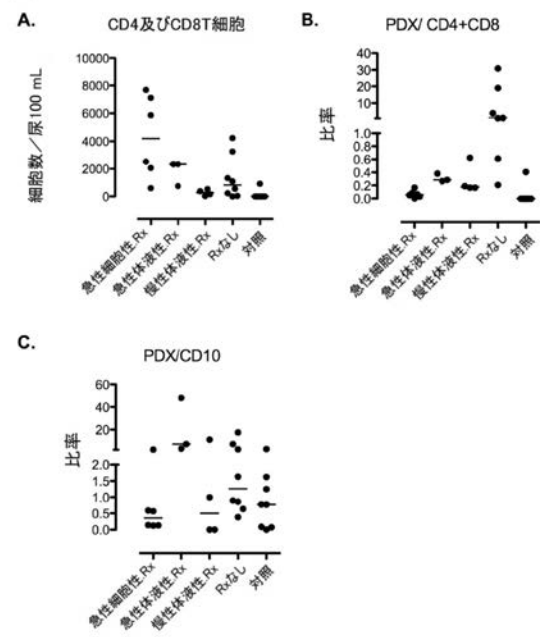
50

【図 1】



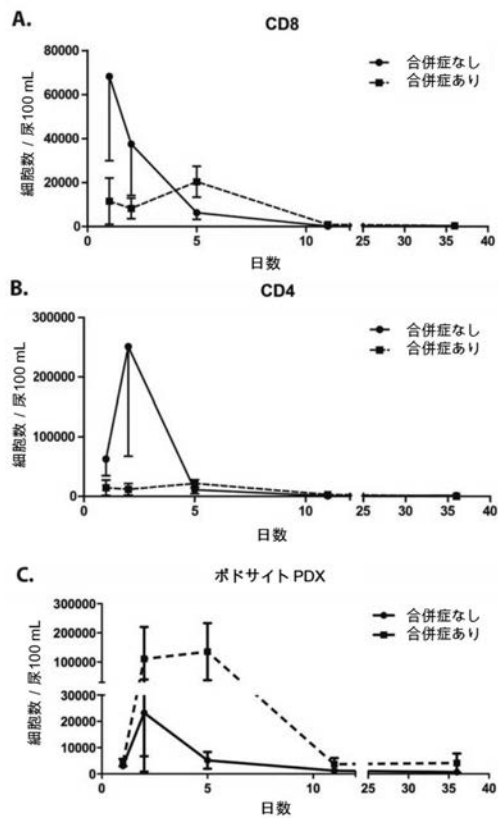
【図 2】

図2



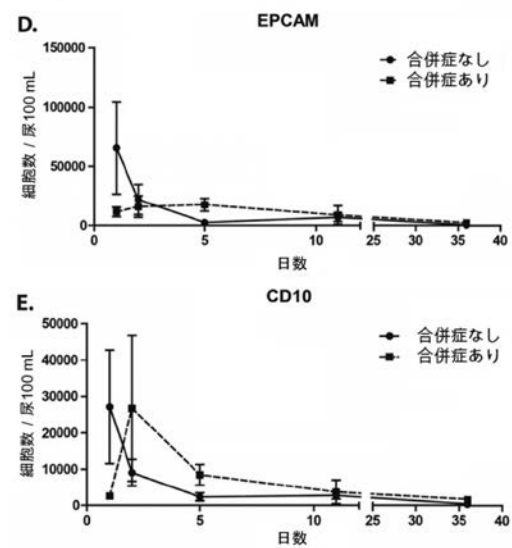
【図 3 A B C】

図3

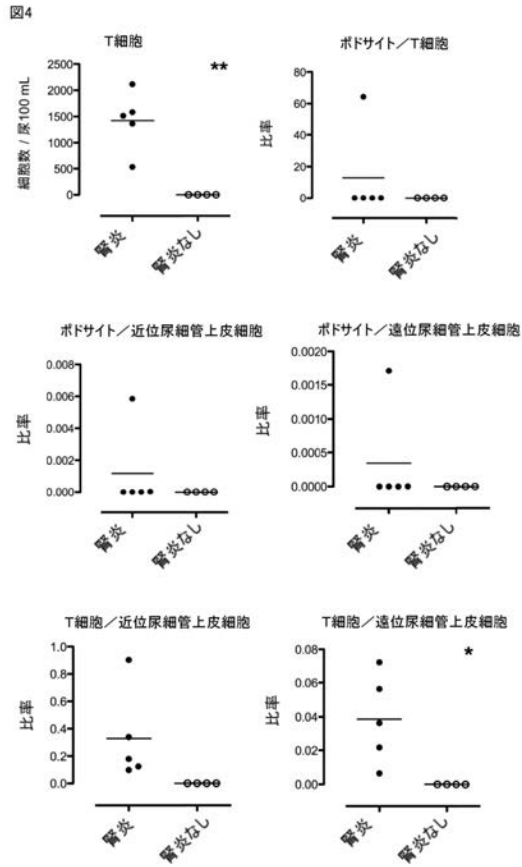


【図 3 D E】

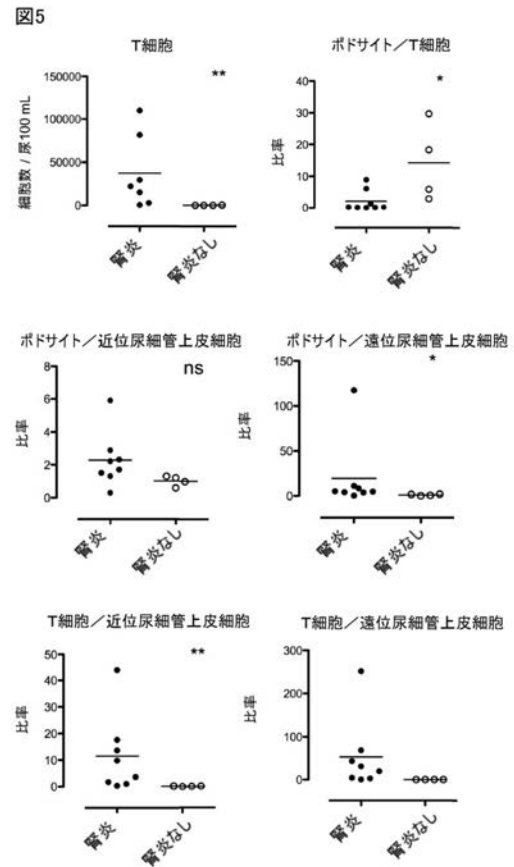
図3 継続



【図 4】



【図 5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/057493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/50

ADD.

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	Charite: "Cell-based urinary biomarkers for renal transplantation rejection", 6 April 2017 (2017-04-06), pages 1-1, XP055435767, DOI: 10.2217/pme-2015-0008 Retrieved from the Internet: URL: https://www.berlinhealthinnovations.com/fileadmin/user_upload/tech-offers/CH846_biomarker_renal_rejection_T0.pdf [retrieved on 2017-12-15] the whole document ----- -/-	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 May 2018

Date of mailing of the international search report

11/05/2018

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) 340-3016

Authorized officer

Behrens, Ralf

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/057493

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MICHAEL NASR ET AL: "Advances in diagnostics for transplant rejection", EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS, vol. 16, no. 10, 2 October 2016 (2016-10-02), pages 1121-1132, XP055435756, GB ISSN: 1473-7159, DOI: 10.1080/14737159.2016.1239530 -----	1-17

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 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	31/573
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 U
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 Y
C 1 2 Q	1/06	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
			A 6 1 P	37/06
			A 6 1 P	13/12
			C 1 2 Q	1/06

(31)優先権主張番号 17190719.9

(32)優先日 平成29年9月12日(2017.9.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

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

(72)発明者 ブランド, ハンナ アントニア
ドイツ国 ベルリン 1 0 7 1 3 メクレンブルク ストラッセ 8 6

(72)発明者 ランハンス, バレリー
ドイツ国 ベルリン 1 0 2 4 5 コペルニクス ストラッセ 1 8

(72)発明者 ラインケ, ペトラ
ドイツ国 ベルリン 1 0 1 1 7 ベーゲルプラッツ 1

Fターム(参考) 2G045 AA24 CB03 DA36 FA37 FB03
4B029 AA07 BB11 CC01 FA04 FA10 FA11
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QR48 QR66 QS10 QS15 QS33
QS39 QX01
4C085 AA13 AA14 CC22 CC23
4C086 AA01 DA10 NA06 ZA81 ZB08

专利名称(译)	尿流式细胞仪作为肾脏疾病的生物标志物		
公开(公告)号	JP2020515832A	公开(公告)日	2020-05-28
申请号	JP2019551950	申请日	2018-03-23
[标]申请(专利权)人(译)	慈善海胆Beruji哲媒体寻柏林		
申请(专利权)人(译)	慈善 - 海胆Beruji哲媒体寻柏林		
发明人	エンガード,フィリップ ゴリッシュ,ニナ ブランド,ハンナ アントニア ランハンス,バレリー ラインケ,ペトラ		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/493 G01N33/53 C12M1/34 A61K31/573 A61K39/395 A61P37/06 A61P13/12 C12Q1/06		
CPC分类号	G01N33/505 G01N33/5091 G01N2800/245 G01N2800/347 G01N2800/52 G01N15/14 G01N33/493		
FI分类号	G01N33/48.M G01N33/493.A G01N33/53.D C12M1/34.D C12M1/34.F A61K31/573 A61K39/395.U A61K39/395.Y A61K39/395.D A61P37/06 A61P13/12 C12Q1/06		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/CB03 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB03 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/CC01 4B029/FA04 4B029/FA10 4B029/FA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS10 4B063/QS15 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC22 4C085/CC23 4C086/AA01 4C086/DA10 4C086/NA06 4C086/ZA81 4C086/ZB08		
优先权	2017162941 2017-03-25 EP 2017165128 2017-04-05 EP 2017190719 2017-09-12 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括以下步骤：提供来自患者的尿液样品，并测量可能患有肾病或经历肾移植排斥的T细胞，足细胞和近端肾小管上皮细胞的浓度。提供一种为患者分配潜力的方法。这些细胞类型的比例用于衡量肾脏疾病或移植排斥的风险。[选择图]图1

Fig. 1

