

(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2021-527835

(P2021-527835A)

(43) 公表日 令和3年10月14日(2021.10.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 C O 8 4
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 C O 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2021-519517 (P2021-519517)
 (86) (22) 出願日 令和1年6月13日 (2019.6.13)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年12月14日 (2020.12.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2019/007121
 (87) 国際公開番号 W02019/240507
 (87) 国際公開日 令和1年12月19日 (2019.12.19)
 (31) 優先権主張番号 10-2018-0069263
 (32) 優先日 平成30年6月15日 (2018.6.15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(71) 出願人 520493429
 コアステム カンパニー リミテッド
 CORESTEM CO., LTD.
 大韓民国 28420 チュンチョンブク
 ード チョンジュンシ フンドクグ ガ
 ロスーロ 1251、302
 (71) 出願人 520493430
 忠北大学校産学協力団
 CHUNGBUK NATIONAL U
 NIVERSITY INDUSTRY-
 ACADEMIC COOPERATIO
 N FOUNDATION
 大韓民国 28644 チュンチョンブク
 ード チョンジュンシ ソウォング チ
 ユンデーロ 1

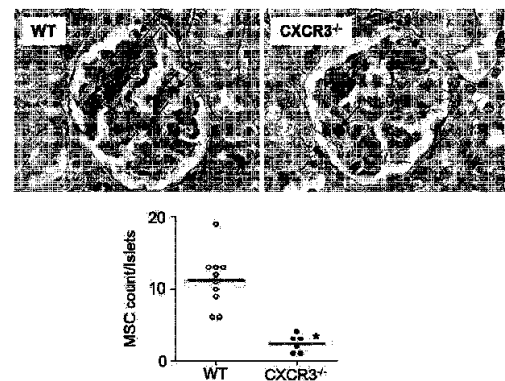
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー、診断キット及び治療用途

(57) 【要約】

本発明は、自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー、診断キット及び治療用途を提供する。より詳しくは、本発明は、ケモカイン受容体である CXCR3 を含む間葉系幹細胞 (MSC) の自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー；ケモカイン CXCL10 を含む自己免疫疾患の治療後予測用バイオマーカー；前記バイオマーカーの発現を測定できる製剤を含む診断キット；及びケモカイン受容体である CXCR3 の発現量が増加された間葉系幹細胞を含む自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学的組成物を提供する。

【選択図】 図 2 a



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ケモカイン受容体である C X C R 3 を含むことを特徴とする、間葉系幹細胞の自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー組成物。

【請求項 2】

前記自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス又はそれによる合併症であることを特徴とする、請求項 1 に記載のバイオマーカー組成物。

【請求項 3】

C X C R 3 の発現レベル又はその m R N A 発現レベルを測定する製剤を含むことを特徴とする、間葉系幹細胞の自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用キット。

10

【請求項 4】

前記 C X C R 3 の発現レベルを測定する製剤は、C X C R 3 に特異的に結合する抗体であり、C X C R 3 の m R N A 発現レベルを測定する製剤は、それに特異的に結合するプライマー、プローブ又はアンチセンスヌクレオチドであることを特徴とする、請求項 3 に記載の有効性予測用キット。

【請求項 5】

前記 C X C R 3 又はその m R N A 発現がないか、野生型間葉系幹細胞より低い場合、治療有効性がないか低いと予測することを特徴とする、請求項 3 に記載のキット。

【請求項 6】

ケモカイン C X C L 1 0 を含む自己免疫疾患の治療予後予測用バイオマーカー組成物であって、

20

前記自己免疫疾患の治療は、C X C R 3 を含む間葉系幹細胞を用いた治療であることを特徴とする、バイオマーカー組成物。

【請求項 7】

前記 C X C L 1 0 は、腎臓から発現されることを特徴とする、請求項 6 に記載のバイオマーカー組成物。

【請求項 8】

前記 C X C L 1 0 を発現する腎臓で、C X C L 1 0 は、C X C R 3 を含む間葉系幹細胞が腎臓に浸潤されるように誘導することを特徴とする、請求項 7 に記載のバイオマーカー組成物。

30

【請求項 9】

前記自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス又はそれによる合併症であることを特徴とする、請求項 6 ~ 請求項 8 のうちいずれか一項に記載のバイオマーカー組成物。

【請求項 10】

間葉系幹細胞 (M S C) から発現されるケモカイン受容体である C X C R 3 の発現量を測定して、自己免疫疾患の治療に対する間葉系幹細胞の有効性を予測するための情報提供方法。

【請求項 11】

ケモカイン受容体である C X C R 3 の発現量を測定して、自己免疫疾患に有効な治療効果を示す間葉系幹細胞をスクリーニングする方法。

40

【請求項 12】

請求項 11 によってスクリーニングされた間葉系幹細胞を含む自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学的組成物。

【請求項 13】

間葉系幹細胞のケモカイン受容体である C X C R 3 ; 又は C X C R 3 の発現量を増加させる製剤 ; を含むことを特徴とする、自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学的組成物。

【請求項 14】

前記 C X C R 3 の発現量を増加させる製剤は、C X C R 3 に特異的に結合する抗体であることを特徴とする、請求項 13 に記載の薬剤学的組成物。

【請求項 15】

50

ケモカイン受容体である C X C R 3 の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞を有効成分で含むことを特徴とする、自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学的組成物。

【請求項 16】

前記 C X C R 3 の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞は、(i) C D 1 0 5、C D 2 9、C D 4 4、C D 7 3 及び C D 9 0 で構成された群から選択される最小 1 種の表面抗原に対して陽性の免疫学的特性；及び (i i) C D 3 4、C D 4 5 及び H L A - D R から構成された群から選択される最小 1 種の表面抗原に対して陰性の免疫学的特性を有することを特徴とする、請求項 15 に記載の薬剤学的組成物。

【請求項 17】

前記自己免疫疾患は、ループス（全身性エリテマトーデス）、関節リウマチ（rheumatoid arthritis）、全身性進行性硬化症（Progressive systemic sclerosis、Scleroderma）、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症（alopecia areata）、乾癬、天疱瘡、喘息、アフタ性口内炎、慢性甲状腺炎、炎症性腸炎、ベーチェット病（Behcet's disease）、クローン病、皮膚筋炎（dermatomyositis）、多発性筋炎（polymyositis）、多発性硬化症（multiple sclerosis）自己免疫性溶血性貧血（Autoimmune hemolytic anemia）、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症（Myasthenia gravis）、グレーブス病（Grave's disease）、結節性多発動脈炎（Polyarteritis nodosa）、強直性脊椎炎（Ankylosing spondylitis）、線維筋痛症（Fibromyalgia syndrome）及び側頭動脈炎（Temporal arteritis）で構成された群から選択されることを特徴とする、請求項 15 に記載の薬剤学的組成物。

【請求項 18】

前記自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデスであることを特徴とする、請求項 15 に記載の薬剤学的組成物。

【請求項 19】

請求項 11 によってスクリーニングされた間葉系幹細胞を含む薬剤学的組成物を個体に投与又は服用させるステップを含む自己免疫疾患の予防又は治療方法。

【請求項 20】

請求項 11 によってスクリーニングされた間葉系幹細胞を含む薬剤学的組成物の自己免疫疾患の予防又は治療用途。

【請求項 21】

間葉系幹細胞のケモカイン受容体である C X C R 3；又は C X C R 3 の発現量を増加させる製剤；を含む薬剤学的組成物を個体に投与又は服用させるステップを含む自己免疫疾患の予防又は治療方法。

【請求項 22】

間葉系幹細胞のケモカイン受容体である C X C R 3；又は C X C R 3 の発現量を増加させる製剤；を含む薬剤学的組成物の自己免疫疾患の予防又は治療用途。

【請求項 23】

ケモカイン受容体である C X C R 3 の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞を有効成分で含む薬剤学的組成物を個体に投与又は服用させるステップを含む自己免疫疾患の予防又は治療方法。

【請求項 24】

ケモカイン受容体である C X C R 3 の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞を有効成分で含む薬剤学的組成物の自己免疫疾患の予防又は治療用途。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2018年6月15日に出願された大韓民国特許出願第10-2018-0

10

20

30

40

50

069263号に基づく優先権の利益を主張し、前記明細書全体は、本出願の参考文献である。

【0002】

本発明は、自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー、診断キット及び治療用途に関する。

【背景技術】

【0003】

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus、SLE)は、多発性機能不全を伴った全身性自己免疫疾患(systemic autoimmune disease)であって、免疫複合体の沈着と炎症細胞の浸潤を特徴とする。

10

【0004】

ループス腎炎(lupus nephritis)は、SLE患者の60%で発生し、罹患率(morbidity)と死亡率(mortality)を増加させる主要原因である。間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells、MSCs)は、溶解性因子及び接触依存的方式(soluble factor-and contact-dependent manners)によりT細胞、B細胞、樹脂状細胞、NK細胞を抑制することができ、Treg細胞を増進させるので、SLEの有望な代替療法として研究されて来た。

【0005】

20

生体内で効能を発揮するために、MSCは、炎症部位に効率的に浸潤する。炎症がある腎臓(nephritic kidney)ではケモカインが生成され、MSCは、ケモカイン受容体を発現する。CCL2、CCL3、CCL5、CXCL10、CXCL12、CXCL13、CX3CL1は、ループスモデル動物とSLE患者の炎症性の腎臓(nephritic kidney)から発現され、炎症細胞の腎臓浸潤を増加させる。また、骨髄由来のMSCは、CCR2、CCR5、CXCR3及びCXCR4を発現するが、ケモカイン反応性と関連してMSCが炎症組織にどのように浸潤するかに対してはほとんど知られていなかった。いくつかの論文は、MSCがCXCL12-CXCR4軸(axis)を用いて炎症組織に浸潤することを示している。しかし、今まで炎症を起こした腎臓へのMSC浸潤に対するCXCL10-CXCR3軸(axis)の役目に対する報告はない。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Yang D、Sun S、Wang Z、Zhu P、Yang Z and Zhang B. Stromal cell-derived factor-1 receptor CXCR4-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells accelerate wound healing by migrating into skin injury areas. Cellular reprogramming. 2013; 15: 206-15

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー、診断キット及び治療用途を提供する。より詳しくは、本発明は、ケモカイン受容体であるCXCR3を含む間葉系幹細胞(MSC)の自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー；ケモカインCXCL10を含む自己免疫疾患の治療予後予測用バイオマーカー；前記バイオマーカーの発現を測定できる製剤を含む診断キット；及びケモカイン受容体であるCXCR3の発現量が増加された間葉系幹細胞を含む自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学

50

的組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、ケモカイン受容体であるCXCＲ3を含む間葉系幹細胞の自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー組成物を提供する。

【0009】

また、本発明は、CXCＲ3の発現レベル又はそのmRNA発現レベルを測定する製剤を含む、間葉系幹細胞の自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用キットを提供する。

【0010】

一具体例で、CXCＲ3の発現レベルを測定する製剤は、CXCＲ3に特異的に結合する抗体であり、CXCＲ3のmRNA発現レベルを測定する製剤は、それに特異的に結合するプライマー、プローブ又はアンチセンスヌクレオチドであってもよい。また、前記キットは、RT-PCRキット、競争的RP-PCRキット、リアルタイムRT-PCRキット、定量的RT-PCRキット又はDNAチップキットであってもよい。

10

【0011】

前記抗体、プライマー、プローブ又はアンチセンスヌクレオチドは、本発明が属する技術分野で公知にされた技術を用いて作製できることは自明である。

【0012】

前記キットにおいて、CXCＲ3又はそのmRNA発現がないか、野生型間葉系幹細胞より低い場合、治療有効性がないか低いことが予測できる。このように、バイオマーカーであるCXCＲ3又はそのmRNA発現を測定することによって、間葉系幹細胞の自己免疫疾患の治療に対する有効性を予測することができる。

20

【0013】

前記自己免疫疾患は、ループス（全身性エリテマトーデス）、関節リウマチ（rheumatoid arthritis）、全身性進行性硬化症（Progressive systemic sclerosis、Scleroderma）、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症（alopecia areata）、乾癬、天疱瘡、喘息、アフタ性口内炎、慢性甲状腺炎、炎症性腸炎、ベーチェット病（Behcet's disease）、クローン病、皮膚筋炎（dermatomyositis）、多発性筋炎（polymyositis）、多発性硬化症（multiple sclerosis）自己免疫性溶血性貧血（Autoimmune hemolytic anemia）、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症（Myasthenia gravis）、グレーブス病（Grave's disease）、結節性多発動脈炎（Polyarteritis nodosa）、強直性脊椎炎（Ankylosing spondylitis）、線維筋痛症（Fibromyalgia syndrome）及び側頭動脈炎（Temporal arteritis）で構成された群から選択され得、特に、全身性エリテマトーデス又はそれによる合併症であってもよい。

30

【0014】

前記合併症は、腎臓損傷（kidney damage）、頭痛、めまい、行動変化（behavior changes）、視力問題（vision problem）脳卒中、発作、貧血、出血、血液凝固、血管炎（vasculitis）、胸膜炎（pleurisy）、肺炎、心膜炎（pericarditis）、心血管疾患、心臓発作、関節炎、関節痛及び筋肉痛からなる群より選択される一つ以上を含むことができるが、これに限定されるものではない。

40

【0015】

また、本発明は、ケモカインCXCＬ10を含む自己免疫疾患の治療予後予測用バイオマーカー組成物を提供する。

【0016】

一具体例で、自己免疫疾患の治療は、CXCＲ3を含む間葉系幹細胞を用いた治療であってもよい。また、CXCＬ10は、腎臓から発現されることが好ましい。前記CXCＬ

50

10を発現する腎臓で、CXCL10は、CXCR3を含む間葉系幹細胞が腎臓に浸潤されるように誘導できる。

【0017】

また、本発明は、CXCL10の発現レベルを測定する製剤を含む自己免疫疾患の治療予後予測用キットを提供する。

【0018】

一具体例で、CXCL10の発現レベルを測定する製剤は、CXCR3に特異的に結合する抗体であってもよい。前記抗体は、本発明が属する技術分野で公知にされた技術を用いて作製することができることは自明である。

【0019】

本発明の一部具体例では、CXCR3及び/又はCXCL10の発現レベルを測定することでのみ記載したが、そのmRNA発現を測定するによってそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを測定することが含まれることは自明である。

【0020】

また、本発明は、間葉系幹細胞(MSC)から発現されるケモカイン受容体であるCXCR3の発現量又はそのmRNA発現レベルを測定して自己免疫疾患の治療に対する間葉系幹細胞の有効性を予測するための情報提供方法を提供する。

【0021】

前記バイオマーカーレベルを測定する方法は、逆転写酵素重合反応(RT-PCR)、競争的逆転写酵素重合酵素反応(competitive RT-PCR)、リアルタイム逆転写酵素重合酵素反応(real time quantitative RT-PCR)、定量的重合酵素反応(quantitative RT-PCR)、RNase保護分析法(RNase protection method)、ノーザンブロッティング(Northern blotting)又はDNAチップ方法(DNA chip technology)、免疫組織化学染色法(immunohistochemical staining)、免疫沈澱分析法(immunoprecipitation assay)、補体固定分析法(complement Fixation Assay)又は免疫蛍光法(immunofluorescence)などを含む。

【0022】

一具体例で、前記自己免疫疾患は、特に、全身性エリテマトーデス又はそれによる合併症であってもよい。

【0023】

また、本発明は、ケモカイン受容体であるCXCR3の発現量又はそのmRNA発現量を測定して自己免疫疾患に有効な治療効果を示す間葉系幹細胞をスクリーニングする方法を提供する。

【0024】

前記スクリーニング方法により選別された間葉系幹細胞の場合、自己免疫疾患の予防又は治療活性に優れる。したがって、前記方法によってスクリーニングされた間葉系幹細胞を含む自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学的組成物を提供することができる。

【0025】

また、本発明は、前記方法によってスクリーニングされた間葉系幹細胞を含む薬剤学的組成物を個体に投与又は服用させるステップを含む自己免疫疾患の予防又は治療方法を提供することができる。

【0026】

また、本発明は、前記方法によってスクリーニングされた間葉系幹細胞を含む薬剤学的組成物の自己免疫疾患の予防又は治療用途を提供することができる。

【0027】

また、本発明は、1)間葉系幹細胞のケモカイン受容体であるCXCR3自体；又は2)CXCR3の発現量を増加させる製剤；を含む、自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学的組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

また、本発明は、間葉系幹細胞のケモカイン受容体である C X C R 3 ; 又は C X C R 3 の発現量を増加させる製剤 ; を含む薬剤学的組成物を個体に投与又は服用させるステップを含む自己免疫疾患の予防又は治療方法を提供することができる。

【 0 0 2 9 】

また、本発明は、間葉系幹細胞のケモカイン受容体である C X C R 3 ; 又は C X C R 3 の発現量を増加させる製剤 ; を含む薬剤学的組成物の自己免疫疾患の予防又は治療用途を提供することができる。

【 0 0 3 0 】

一具体例において、C X C R 3 の発現量を増加させる製剤は、C X C R 3 に特異的に結合する抗体であってもよい。前記抗体の場合、その誘導体、又はその生物学的等価物が含まれると判断されなければならない、抗体、その誘導体、又はその生物学的等価物は、本発明が属する技術分野で公知にされた技術を用いて作製することができることは自明である。前記抗体の誘導体及びその生物学的等価物は、C X C R 3 の発現量を増加させるために C X C R 3 に特異的に結合する抗体の等価的活性を示すことを言い、アミノ酸配列の変更、結実、添付などによる変異又は各種置換体を含む。

10

【 0 0 3 1 】

また、本発明は、ケモカイン受容体である C X C R 3 の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞を有効成分で含む、自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学的組成物を提供する。

20

【 0 0 3 2 】

また、本発明は、ケモカイン受容体である C X C R 3 の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞を有効成分で含む薬剤学的組成物を個体に投与又は服用させるステップを含む自己免疫疾患の予防又は治療方法を提供することができる。

【 0 0 3 3 】

また、本発明は、ケモカイン受容体である C X C R 3 の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞を有効成分で含む薬剤学的組成物の自己免疫疾患の予防又は治療用途を提供することができる。

【 0 0 3 4 】

一具体例で、前記 C X C R 3 の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞は、(i) C D 1 0 5、C D 2 9、C D 4 4、C D 7 3 及び C D 9 0 で構成された群から選択される最小 1 種の表面抗原に対して陽性の免疫学的特性 ; 及び (i i) C D 3 4、C D 4 5 及び H L A - D R で構成された群から選択される最小 1 種の表面抗原に対して陰性の免疫学的特性を有する。

30

【 0 0 3 5 】

前記自己免疫疾患は、ループス (全身性エリテマトーデス)、関節リウマチ (r h e u m a t o i d a r t h r i t i s)、全身性進行性硬化症 (P r o g r e s s i v e s y s t e m i c s c l e r o s i s、S c l e r o d e r m a)、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症 (a l o p e c i a a r e a t a)、乾癬、天疱瘡、喘息、アフタ性口内炎、慢性甲状腺炎、炎症性腸炎、ベーチェット病 (B e h c e t ' s d i s e a s e)、クローン病、皮膚筋炎 (d e r m a t o m y o s i t i s)、多発性筋炎 (p o l y m y o s i t i s)、多発性硬化症 (m u l t i p l e s c l e r o s i s) 自己免疫性溶血性貧血 (A u t o i m m u n e h e m o l y t i c a n e m i a)、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症 (M y a s t h e n i a g r a v i s)、グレーブス病 (G r a v e ' s d i s e a s e)、結節性多発動脈炎 (P o l y a r t e r i t i s n o d o s a)、強直性脊椎炎 (A n k y l o s i n g s p o n d y l i t i s)、線維筋痛症 (F i b r o m y a l g i a s y n d r o m e) 及び側頭動脈炎 (T e m p o r a l a r t e r i t i s) で構成された群から選択され得、特に、全身性エリテマトーデス又はそれによる合併症であってもよい。

40

【 0 0 3 6 】

50

本発明の組成物が薬剤学的組成物で製造される場合、本発明の薬剤学的組成物は、薬剤学的に許容される担体を含むことができる。本発明の薬剤学的組成物に含まれる薬剤学的に許容される担体は、製剤時に通常的に用いられるものであって、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、澱粉、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギネート、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微細結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ミネラルオイル、食塩水、PBS (phosphate buffered saline) 又は培地などを含むが、これに限定されるものではない。

【0037】

10

本発明の薬剤学的組成物は、経口投与、局所（頬側、舌下、皮膚又は眼球）投与、経皮性投与又は非経口（皮下、皮内、筋肉内、血管内又は関節内）投与することができ、好ましくは、非経口投与方式、より好ましくは、血管内投与することができる。

【0038】

本発明の薬剤学的組成物の適合する投与量は、製剤化方法、投与方式、患者の年齢、体重、性別、病的状態、飲食、投与時間、投与経路、排泄速度及び反応感応性のような要因によって多様に処方され得る。本発明の薬剤学的組成物の一般的な投与量は、成人を基準として1日当たり $10^2 - 10^{10}$ 細胞である。

【0039】

また、本発明は、ケモカイン受容体であるCXCR3の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞の自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学的製剤を製造するための用途を提供する。

20

【0040】

また、本発明は、1) 間葉系幹細胞(MSC)から発現されるケモカイン受容体であるCXCR3又はそのmRNAの発現量を測定するステップ；及び

2) ケモカイン受容体であるCXCR3の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞を自己免疫疾患の治療に必要な個人に投与するステップを含む自己免疫疾患の治療方法を提供する。

【0041】

一具体例で、前記CXCR3の発現量が野生型に比べて増加された間葉系幹細胞は、(i) CD105、CD29、CD44、CD73及びCD90で構成された群から選択される最小1種の表面抗原に対して陽性の免疫学的特性；及び(ii) CD34、CD45及びHLA-DRで構成された群から選択される最小1種の表面抗原に対して陰性の免疫学的特性を有する。

30

【0042】

前記(i) CD105、CD29、CD44、CD73及びCD90で構成された群から選択される最小1種の表面抗原に対して陽性の免疫学的特性；及び(ii) CD34、CD45及びHLA-DRから構成された群より選択される最小1種の表面抗原に対して陰性の免疫学的特性を有する間葉系幹細胞は、本出願人であるコアステムの大韓民国出願第10-2014-0097129号に詳しく記載されており、前記出願の内容は、本願の参照として挿入される。

40

【発明の効果】

【0043】

本発明によると、自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー、診断キット及び治療用用途を提供することができる。特に、本発明は、ケモカイン受容体であるCXCR3を含む間葉系幹細胞(MSC)の自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー；ケモカインCXCL10を含む自己免疫疾患の治療予後予測用バイオマーカー；前記バイオマーカーの発現を測定できる製剤を含む診断キット；及びケモカイン受容体であるCXCR3の発現量が増加された間葉系幹細胞を含む自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学的組成物を提供することができる。特に、本発明は、MSC浸潤に対するCX

50

CL10 - CXCR3 軸 (axis) の役目を明確に糾明することができるので、自己免疫疾患、特に、全身性エリテマトーデスの予防又は治療効果を示すかそれを改善することができる。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1a - e】図1は、MRL . Fas^{1P}マウスにMSCs又はシクロホスファミド (cyclophosphamide, CP) を12週齢で一回静脈注射した後、生存率 (図1の(a))、体重 (図1の(b))、anti-dsDNA IgGレベル (図1の(c)) 及び総IgGレベル (図1の(d)) を測定した結果を示すグラフである。WT: wild type、CXCR3^{-/-}: CXCR3が欠乏されたタイプ (*p < 0.01 versus control)。

【図2a - e】図2は、CXCR3を発現する間葉系幹細胞の腎臓浸潤を分析した図である。図2の(a)は、C57BL/6マウスに由来するMSC (H-2^d) をMRL . Fas^{1P}マウス (H-2^k) に静脈注射して24時間後に脾臓を分離し、抗-マウスMHC-I (H-2^d) 抗体 (anti-mouse MHC-I (H-2^d) antibody) を用いて染色した後、アイレット (islet) 当たりH-2^d 陽性MSCの数を計数したものを示す。図2の(b)は、8週齢又は22週齢のMRL . Fas^{1P}マウスの腎臓から総RNAを分離した後、CXCL10及びCXCL12の遺伝子発現レベルをリアルタイムPCRで測定した結果である。*p < 0.01 versus control。図2の(c)は、フローサイトメトリー (flow cytometry) を用いてCMTMR - 標識MSC (CMTMR - labeled MSCs) 及びCMFDA - 標識内皮細胞 (CMFDA - labeled endothelial cells) の結合速度 (binding rates) を分析した結果を示す (n = 3)。接合率 (conjugation ratio) は、CMFDA / CMTMX二重陽性反応 (double-positive events) のポーション (portion) で計算された。*p < 0.01。図2の(d)は、MSCを100ng/mlのCXCL10で24時間の間処理した後、MMP-2、MMP-9及びTIMP-1の遺伝子発現レベルをリアルタイムPCRで測定した結果を示す。*p < 0.01。図2の(e)は、MSCを100ng/mlのCXCL10で24時間の間処理した後、リアルタイムPCRを用いてα4インテグリン、β1インテグリン及びCD44の遺伝子発現程度を測定した結果を示す。*p < 0.01。

【図3a - f】図3は、CXCR3^{-/-} MSCの免疫抑制能力を分析した結果である。図3の(a)は、WT及びCXCR3^{-/-}マウスから生成されたMSCから総RNA及びタンパク質を分離し、CCR5、CCR7、CXCR3及びCXCR4のレベルをRT-PCR (real-time PCR) 及びウェスタンブロット (WB) により測定した結果を示す。図3の(b)は、MSC移動 (MSC migration) を分析した結果を示す。MSC移動は、8μm気孔フィルタ (Costar, Corning, Cambridge, MA, USA) のあるトランスウェルプレートを用いてトランスウェルアッセイ (transwell assay) で確認した。上部ウェルを37℃で2時間の間0.1%ゼラチン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) でコーティングした後、200μlの培地での2×10⁴ MSC (2×10⁴ MSCs in 200ml of medium) を上部ウェルにローディングし、下部ウェルには、10% FBS及び100ng/ml CXCL10 (R&Dシステム、Minneapolis, MN, USA) を含有する500μlの培地を添加した後、24時間後、フィルタ上部の非移動細胞を除去して膜を10%ホルマリンで固定させた後、フィルタの下側に移動したMSCsを0.5%水晶紫色で10分間染色し、移動されたMSCの数を倒立光学顕微鏡 (inverted light microscope) で計数した。*p < 0.01。図3の(c)は、96ウェルプレート (well plate) にMSCを0.03 - 0.3×10⁵ cells/wellで添加し、T細胞を1×10⁵ cells/wellで添加し、コンカナバリンA (concanavalin A)

を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加して 72 時間の間培養した後、培地に蓄積された IFN- γ のレベルを ELISA キットを用いて測定した結果を示す。* $p < 0.01$ 。図 3 の (d) は、96 ウェルプレートに MSC を $0.03 - 0.3 \times 10^5 \text{ cells}/\text{well}$ で添加し、B 細胞を $1 \times 10^5 \text{ cells}/\text{well}$ で添加し、リポ多糖 (lipopolysaccharide) を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加して 72 時間の間培養した後、培地に蓄積された IgM のレベルを ELISA キットを用いて測定した結果を示す。* $p < 0.01$ 。図 3 の (e) 及び図 3 の (f) は、MSC 培養 20 日目に新しい培地に交替し、24 時間後に培地から可溶性因子のレベルを測定した結果を示す。Griess 試薬で NO レベルを測定し、ELISA キット (R&D systems、Minneapolis、MN、USA) を用いて TGF- β と PGE2 のレベルを測定した。

10

【発明を実施するための形態】

【0045】

以下、実施例を通じて本発明をより詳細に説明する。本発明の目的、特定、長所は、以下の実施例を通じて容易に理解される。本発明は、ここで説明する実施例に限定されず、他の形態で具体化され得る。ここで紹介される実施例は、本発明が属する技術分野で通常の知識を有した者に本発明の思想が十分に伝達されるようにするために提供されるものである。したがって、以下の実施例によって本発明が制限されてはいけない。

【0046】

< 実施例 >

[材料及び方法]

20

(間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells))

マウス MSC は、6 ~ 8 週齢の C57BL/6 マウス (Orient Bio、京畿道所在) 又は CXCR3^{-/-} (B6.129P2-Cxcr3^{tm1Dgen}/J) マウス (Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME、USA) の脛骨 (tibiae) 及び大腿骨 (femurs) の BM (Bone marrow) 細胞から収得した (CXCR3^{-/-} は、CXCR3 が欠乏された形態を示す)。BM 細胞は、10% ウシ胎児血清 (PBS、fetal bovine serum)、2 mM L-グルタミン (L-glutamine) 及びペニシリン/ストレプトマイシン (penicillin/streptomycin) を含む α -MEM 培地で 37[°]、5% CO₂ 条件で培養した。非付着性細胞 (non-adherent cells) を 1 日目に除去し、付着細胞を 3 日ごとに培地を補充 (medium replenishment) して培養した後、17 日から 20 日の間に用いた。全ての動物実験は、忠北大学校動物実験倫理委員会の承認を受けて承認された指針によって実行された。

30

【0047】

(MRL.Fas^{Lpr} マウスモデル)

MRL.Fas^{Lpr} マウスは、Jackson Laboratory (Bar Harbor、Maine、USA) から購入した。マウスは、12 時間の明暗周期 (12 h light/dark cycle) 下で 21 ~ 24[°] 及び 40 ~ 60% の相対湿度条件の特定病原菌がない状態で保管された。MRL.Fas^{Lpr} マウスに PBS (リン酸塩緩衝生理食塩水、コントロール、n = 6)、シクロホスファミド (cyclophosphamide、50 mg/kg、n = 6)、野生型 (wild-type) MSC ($1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{injection}$ 、n = 6) 及び CXCR3^{-/-} MSCs ($1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{injection}$ 、n = 6) を 12 週で一回腹腔内注射した。生存率と体重は毎週測定した。Sigma-Aldrich、Alpha Diagnostic International (San Antonio、TX、USA) 及び eBioscience (San Diego、CA、USA) から購入した ELISA キットを用いて尿 (urine) でのタンパク質レベルと、血清での抗-dsDNA IgG 及び総 IgG を測定した。免疫化学染色 (immunohistochemistry) のために、18 週齢の MRL.Fas^{Lpr} マウス (H-2^k) に MSC (H-2^d) を $1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{injection}$ で静脈注射した。24 時間後、腎臓

40

50

に浸潤したMSCの数は、マウスMHC-1 (H-2^d) に対する一次マウス抗体 (primary mouse antibody against mouse MHC-1 (H-2D^b)) と、HRP (horseradish peroxidase; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) と接合された二次抗体 (secondary antibody) の抗-マウス (anti-mouse) IgGを用いて決定し、ヘマトキシリン (hematoxylin) で対照染色 (counter-stained) した。

【0048】

(リアルタイム-PCR)

トリゾール試薬 (TRIzol Reagent, Thermo Fisher Scientific) を用いて脾臓細胞からtotal RNAを分離した。分光光度計を用いてRNAを定量して1mg/mlの濃度で-80℃で保管した。cDNAは、RTキット (Bioneer、大田、韓国) を用いて3μg総RNA (total RNA) から合成した。CCR5、CCR7、CXCR3、CXCR4、iNOS、TGF-β及びCOX-2に対するmRNAの発現レベルをPCRで分析した。用いられたプライマー配列は、次の通りである：CCR5、センス、5'-GCT GAA GAG CGT GAC TGA TA-3' (配列番号1)、アンチセンス、5'-GAG GAC TGC ATG TAT AAT GA-3' (配列番号2)；CCR7、センス、5'-ACA GCG GCC TCC AGA AGA ACA GCG G-3' (配列番号3)；アンチセンス、5'-TGA CGT CAT AGG CAA TGT TGA GCT G-3' (配列番号4)；CXCR3、センス、5'-GTA CAC GC A GAG CAG TGC G-3' (配列番号5)、アンチセンス、5'-GAA CGT CAA GTG CTA GAT GCC TCG-3' (配列番号6)；CXCR4、センス、5'-GGC TGT AGA GCG AGT GTT GC-3' (配列番号7)、アンチセンス、5'-GTA GAG GTT GAC AGT GT A GAT-3' (配列番号8)；iNOS、センス、5'-CCT TCC GAA GTT TCT GGC AGC AGC-3' (配列番号9)、アンチセンス、5'-GGC TGT CAG AGC CTC GGG CTT TGG G-3' (配列番号10)；TGF-β、センス、5'-TGA CGT CAC TGG AGT TG T AC-3' (配列番号11)、アンチセンス、5'-GGT TCA TGT CA T GGA TGG TG-3' (配列番号12)；COX-2、センス、5'-GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT-3' (配列番号13)、アンチセンス、5'-ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA-3' (配列番号14)；β-actin、センス、5'-TGG AAT CCT GTG GCA TC C ATG AAA C-3' (配列番号15) 及びアンチセンス5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3' (配列番号16) 'を含む。PCR産物は、1%アガロースゲルから分離し、5μg/ml臭化エチジウム (ethidium bromide) で染色した。

【0049】

SYBR Green Master Mix (Qiagen, Hilden, GER) とStepOnePlusリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて定量的PCR (quantitative PCR) を実行した。用いられたプライマー配列は、次の通りである；CXCL10、センス、5'-GGC TGG TCA CCT TTC AGA AG-3' (配列番号17)、アンチセンス、5'-ATG GAT GGA CAG CAG AGA GC-3' (配列番号18)；CXCL12、センス、5'-GAG CCA ACG TCA AGC ATC TG-3' (配列番号19)、アンチセンス、5'-CGG GTC AAT GCA CAC TTG TC-3' (配列番号20)；MMP-2、センス、5'-CAA GTT CCC CGG CGA TGT C-3' (配列番号21)、アンチセンス、5'-TTC TGG TCA AGG TCA CCT GTC-3' (

配列番号22) ; MMP - 9、センス、5' - CTG GAC AGC CAG ACA
CTA AAG - 3' (配列番号23)、アンチセンス、5' - CTC GCG GC
A AGT CTT CAG AG - 3' (配列番号24) ; TIMP - 1、センス、5'
' - TTA TCC CAT TGG GGC ATT TA - 3' (配列番号25)、
アンチセンス、5' - TTG CTG CCT TTG ACT GAT TG - 3' (配列番号26) ;
インテグリン α 4、センス、5' - CTC CCT CAA GAT
GAT AAG TTG TTC AA' (配列番号27)、アンチセンス、5' - TG
T GCA AAT GTA CAC TCT CTT CCA - 3' (配列番号28)
; インテグリン β 1、センス、5' - GGC TGA AGA TTA CCC TAT
' (配列番号29)、アンチセンス、5' - CAT TCA TCA AAT CCG
TTC - 3' (配列番号30) ; CD44、センス、5' - GAC CGG TTA C
CA TAA CTA TTG TC' (配列番号31)、アンチセンス、5' - CAT
CGA TGT CTT CTT GGT GTG - 3' (配列番号32)。各サンプ
ルの相対的mRNA量は、ハウスキーピング遺伝子 (housekeeping gene)
である β -actinのCt (threshold cycle) と比較した臨界周
期 (threshold cycle、Ct) を基準に計算された。

【0050】

(ウエスタンブロット (Western blot))

細胞溶解物 (cell lysates) を準備して界面活性剤 - 不溶性物質 (detergent-insoluble materials) を除去した後、同量のタンパク質を10% SDS-PAGEに分画して純粋な (pure) ニトロセルロース膜に移した。膜を5%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin、BSA) を含有するTBS/Tween 20 (TTBS) で1時間の間ブロッキングした後、5% BSAを含有するTTBS内の1次抗体の適切な希釈液と共に2時間の間インキュベーションした。

【0051】

ブロット (blot) をビオチン標識二次抗体 (biotinylated secondary antibody) と共に1時間の間培養した後、HRP - 結合されたストレプトアビジン (HRP-conjugated streptavidin) で1時間の間インキュベーションした。シグナルは、ECL (enhanced chemiluminescence; Amersham Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ、USA) により検出された。CCR5、CCR7、CXCR3及びCXCR4に対する抗 - マウス抗体は、Cell Signaling Technology (Danvers、MA、USA) から購入した。

【0052】

(免疫組織化学 (Immunohistochemistry / migration assay))

20週齢のMRL Fas^{1Pr}マウスにMSCsを静脈注射した (1×10^6 cell / injection)。24時間後に腎臓をMRL Fas^{1Pr}マウスから分離して4%ホルマリンで固定させてPBSに浸した。エタノールとキシレンで脱水させた後、組織をパラフィンに挿入して4 μ m切片 (section) に切った後、抗原賦活化 (antigen retrieval) のために切片をマイクロウェーブオーブン (650W、20分) で加熱した後、3%過酸化水素 (3% hydrogen peroxide) で内因性ペルオキシダーゼ活性 (endogenous peroxidase activity) を遮断させた。その後、切片を1次抗体と共にインキュベーションした (マウスMHC - 1 H - 2Db (diluted 1:100; Abcam、Cambridge、UK) に対するマウス抗体、4℃で一晩恒温処理)。その後、全ての切片をHRP (horseradish peroxidase; Vector Laboratories、Burlingame、CA、USA) と接合された2次抗体の抗 - マウスIgGと共に室温で1時間の間インキュベーションした。2 - 成分 (two - com

10

20

30

40

50

ponent) 高感度DAB (diaminobenzidine) 発色基質 (chromogenic substrate、Vector Laboratories、Burlingame、CA、USA) を用いて10時間の間シグナルを成長 (develop) させてヘマトキシリン (hematoxylin) でカウンター染色した。

【0053】

(セルバインディングアッセイ (Cell binding assay))

内皮細胞 (endothelial cells、 1×10^6 cells/ml) は、37 で10分間無血清培地 (serum-free medium) で0.5 μ M CMFDA (Life Technologies) 及び5 μ M CMTPX (Thermo Fisher Scientific) を含むMSCで標識した。染色した後、細胞を10% FBSを含有する培養培地で2回洗浄した。MSCs (1×10^6) と内皮細胞 (1×10^6) を12 $\times$ 75 mmポリスチレンチューブ (BD Biosciences) で混合して800 rpmで1分間遠心分離した後、ペレットを37 で10分間培養した。その後、細胞混合物を柔らかく懸濁させてフローサイトメトリー (flow cytometry) で分析した。接合率 (conjugation ratio) は、CMFDA / CMTPX二重陽性反応 (double-positive events) のポーション (portion) で計算された。

10

【0054】

(統計分析)

データは、試験管内 (in vitro) 又は生体内 (in vivo、6匹マウス) で実行された3回以上の独立的な実験の平均 $\pm$ SEMを示す。p値は、Graph Pad Prism Software (San Diego、CA、USA) の一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を用いて計算した。

20

【0055】

[実験結果]

(CXCR3^{-/-} MSCの治療活性 (therapeutic activity) 分析)

まず、MRL . Fas^{LPR} マウスモデルでCXCR3^{-/-} MSC (CXCR3が欠乏されたMSC) の治療活性 (therapeutic activity) を確認した。WT MSC (wild type MSC) は、マウス生存期間を著しく延長させた：WT MSCを受けたマウスの66%は、22週まで生存したが、対照群マウスは、16%のみ生存した (図1の(a))。一方、CXCR3^{-/-} MSCを受けたマウスの場合、ただ33%のみ生存した (図1の(a))。MSCは、体重に影響を及ぼさないことが確認された (図1の(b))。WT MSCは、anti-dsDNA (図1の(c)) と総IgG抗体 (図1の(d)) の血清レベル及び蛋白尿レベル (図1の(e)) を減少させたが、CXCR3^{-/-} MSCは、減少させなかった。陽性対照群 (positive compound) で用いられるシクロホスファミド (Cyclophosphamide) も疾病を緩和させた。このようなデータは、CXCR3^{-/-} MSCがMRL . Fas^{LPR} マウスでループス症状を好転させないことを示す。

30

【0056】

(MSCの腎臓浸潤の分析)

図2は、CXCR3を発現する間葉系幹細胞の腎臓浸潤効果を分析した図である。WT MSCsは、CXCR3^{-/-} MSC細胞より炎症のある腎臓によく移動 (ホーミング) することが確認された (図2の(a))。22週齢のMRL . Fas^{LPR} マウスの腎臓は、8週齢に比べてCXCL10を高く発見させたが、二つのマウスが全て同様にCXCL12を発現させた (図2の(b))。このようなデータは、炎症性腎臓がCXCL10を高く発現させ得、これは腎臓に対するMSC誘導を増加させ得ることを示唆する。次に、CXCL10がMSC浸潤をどのように増加させるかに対して分析した。CXCL10は、WT MSCと内皮細胞の接合を増加させたが、これは腎臓へのMSC浸潤のために重要な段階である。しかし、CXCR3^{-/-} MSCは、内皮細胞との接合を増加させ

40

50

なかった(図2の(c))。また、CXCL10は、間質移動(interstitial migration)に重要な酵素であるMMP-2とMMP-9の発現を増加(図2の(d))させたが、MSCによる $\alpha 4 / \beta 1$ インテグリン(integrin)とCD44の発現には影響を及ぼさなかった(図2の(e))。このような結果は、CXCL10が炎症性腎臓(nephritic kidney)でのMSC浸潤を向上させる重要なケモカインであることを示唆する。

【0057】

(CXCR3^{-/-} MSCの免疫抑制能力の分析)

CXCR3^{-/-} MSC腎臓浸潤能力の欠陥にもかかわらずWT MSCと類似した表現型を示した。MSCのマーカーとして知られたCD34及びMHC-IIを発現するが、CD73及Sca-1は発現しなかった。RT-PCR、Real-time PCRとWB(Western blot)を用いて分析した結果、WT MSCsは、CCR5、CXCR3、CXCR4を発現したが、CXCR3^{-/-} MSCは、CXCR3を発現せず、CCR5とCXCR4は、発現することが確認された(図3の(a))。また、CXCR3^{-/-} MSCは、トランスウェル分析でCXCL10側に移動しなかった(図3の(b))。しかし、CXCR3^{-/-} MSCは、WT MSCと同様にT細胞のIFN- γ 生産とB細胞のIgM生産を抑制した(図3の(c)、図3の(d))。WT MSCと同様に、CXCR3^{-/-} MSCは、iNOS、TGF- β 及びCOX-2 mRNAを発現(図3の(e))し、NO、TGF- β 及びPGE₂を生産した(図3の(f))。このような結果は、CXCR3^{-/-} MSCsがCXCL10に移動しないことを除いては、WT MSCと類似した表現型(phenotypes)及び免疫抑制能力(immunosuppressive capacity)を有していることを示唆する。

【0058】

MSCの腎臓浸潤は、多段階過程である：一番目の段階は、血管系を通じて炎症部位に伝達されるMSCの全身投与(systemic administration)である。二番目の段階は、血液中のMSCの捕獲(capture)、圧延(rolling)、内皮細胞接着(adhesion to the endothelium)及び内皮細胞透過(transendothelial migration)で構成される。最後段階は、間質移動(interstitial migration)である。白血球の圧延(rolling)及び付着(adhesion)は、L-セレクチン(L-selectin)、VLA-4及びLFA-1に依存するが、MSCの場合はそうではないかも知れない。炎症組織の内皮細胞がE-セレクチン、P-セレクチン、VCAM-1及びICAM-1を発現し、MSCは、CD44及び $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンを発現し、これらの相互作用によってMSCが内皮細胞に堅固に付着され得ると報告されたことがある。私たちのデータによると、MSCは、CXCL10刺激がない場合にもCD44とVLA-4をよく発現したが、これは、内皮細胞に結合するMSCがCXCL10に独立的に作用することを意味することができる。また他のCXCL10-非依存的機序(CXCL10-independent mechanism)として、白血球より大きいMSCは、マイクロキャピラリー(microcapillaries)で非特異的に抑留され得る。CXCL10がMSCと内皮細胞の接合を増加させる方法を明確にするためにはもっと多くの研究が必要である。

【0059】

ループス性マウス(lupus-prone mice)とSLE患者の炎症性腎臓(nephritic kidney)は、CCL2、CCL3、CCL5、CXCL10、CXCL12、CXCL13及びCX3CL1を高く発現するが、これは、炎症性腎臓に炎症細胞の移動を誘導する。SLE患者の場合、腎臓にCXCR3⁺T細胞が多く、血液には少ない。CXCL10は、SLE患者で最も多く増加し、腎臓でCXCR3⁺免疫細胞と同一な地域に分布する。炎症性腎臓(nephritic kidney)に対する免疫細胞浸潤に対してはよく知られているが、MSC浸潤ではほとんど知られなかった。MSCは、CCR2、CCR5、CXCR3及びCXCR4を発現すると知られている

。そのうち、CCR2とCXCR4は、心臓と皮膚へのMSC浸潤に対する調節因子としてよく知られている。しかし、MSCが炎症のある腎臓に移動するためにCXCR3が必要であるかは知られていない。本実験データでは、腎臓炎の腎臓へのMSC浸潤においてCXCR3の重要な役目を示す。CXCR3 - 欠乏 (CXCR3 - deficient) MSCは、WT MSCよりMRL.lprマウスで内皮細胞に対する結合力が少なく、MMP9発現が少なく、炎症性腎臓への浸潤が少なく、結果的に、ループス症状の改善効果が低いと確認された。ただし、CXCR3 - 欠乏MSCは、WT MSCと類似した増殖及び免疫抑制能力を示した。

【0060】

本発明は、診断分類 (diagnosis classification) 及び進行性ループス腎炎 (progression lupus nephritis) に対する非侵襲的バイオマーカー (non-invasive biomarkers) の開発に影響を及ぼし得る。SLE患者で非活性LN (lupus nephritis) に緩和 (remission) されながら尿 (urine) CXCL10は減少される。これは、治療後SLE患者のLN改善をモニタリングするにおいて良いバイオマーカーであることを示唆する。CXCR3に対するMSCの遺伝子組換えは、SLE患者の治療効能を向上させることにおいて有望な戦略である。損傷された部位に対するMSCの浸潤過程を理解することは、MSCの治療効能を向上させるツール (tool) を提供することができる。

【産業上の利用可能性】

【0061】

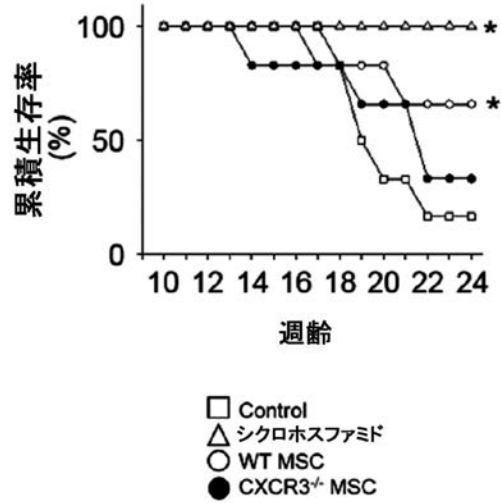
本発明によると、自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー、診断キット及び治療用途を提供することができる。特に、本発明は、ケモカイン受容体であるCXCR3を含む間葉系幹細胞 (MSC) の自己免疫疾患の治療に対する有効性予測用バイオマーカー；ケモカインCXCL10を含む自己免疫疾患の治療予後予測用バイオマーカー；前記バイオマーカーの発現を測定できる製剤を含む診断キット；及びケモカイン受容体であるCXCR3の発現量が増加された間葉系幹細胞を含む自己免疫疾患の予防又は治療用薬剤学的組成物を提供することができる。特に、本発明は、MSC浸潤に対するCXCL10 - CXCR3軸 (axis) の役目を明確に糾明することができるので、自己免疫疾患、特に、全身性エリテマトーデスの予防又は治療効果を示すかこれを改善することができる。

10

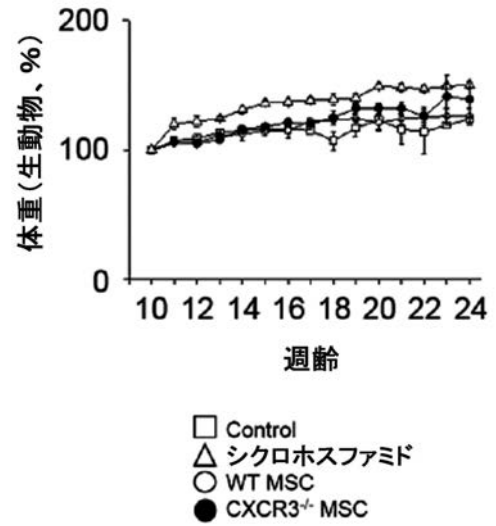
20

30

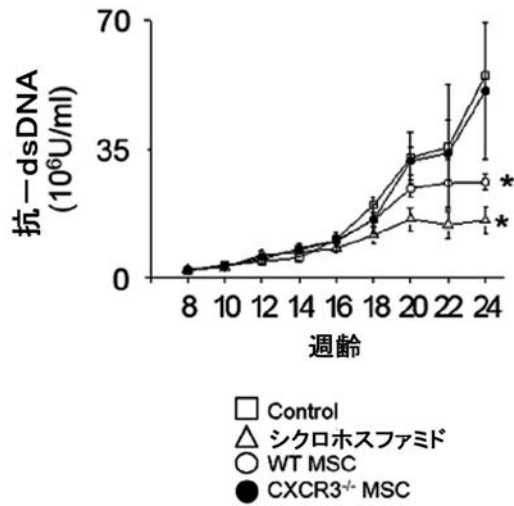
【図 1 a】



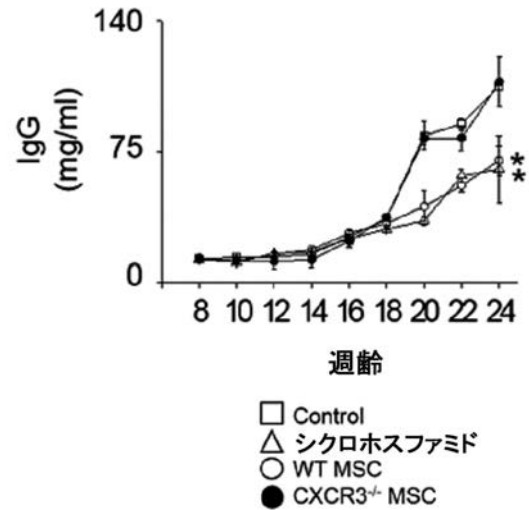
【図 1 b】



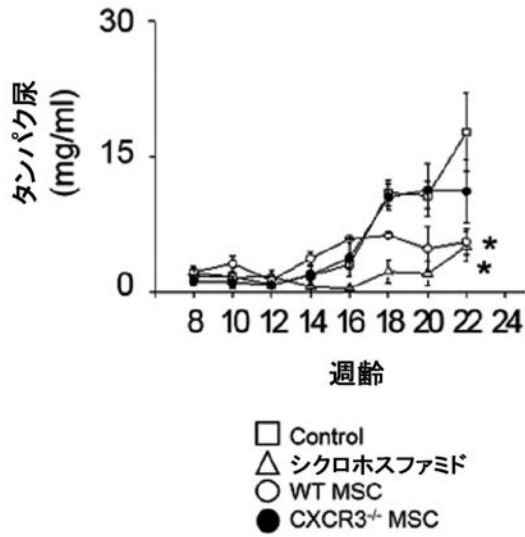
【図 1 c】



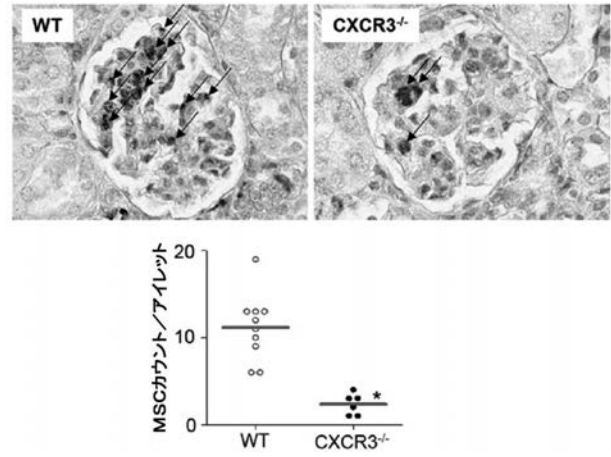
【図 1 d】



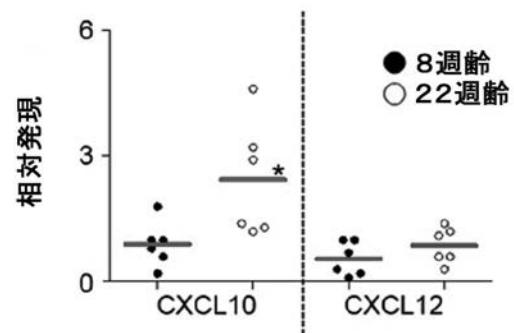
【図 1 e】



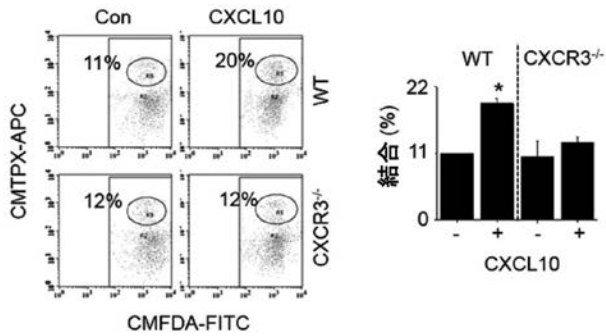
【図 2 a】



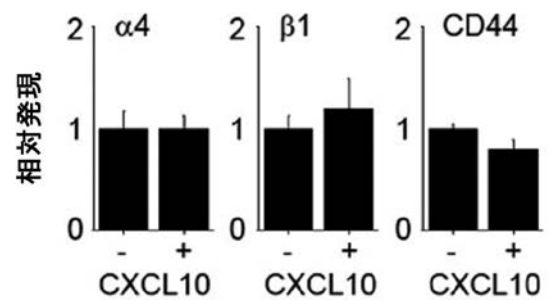
【図 2 b】



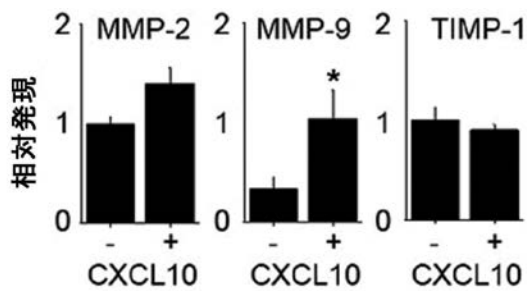
【図 2 c】



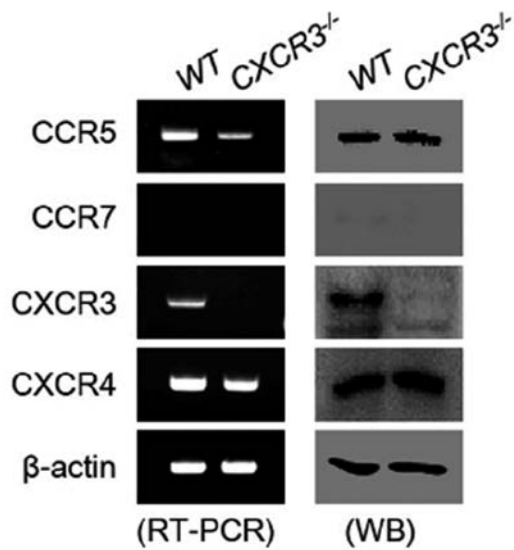
【図 2 e】



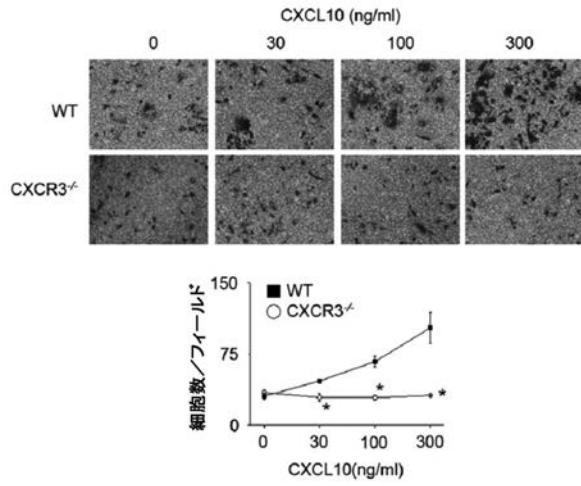
【図 2 d】



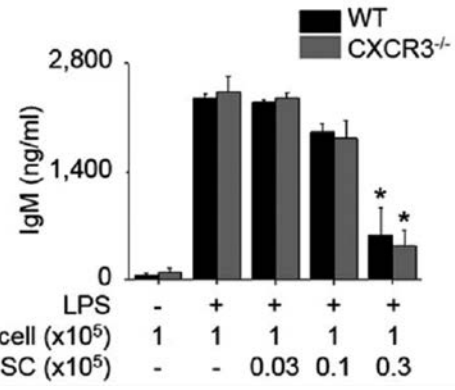
【図 3 a】



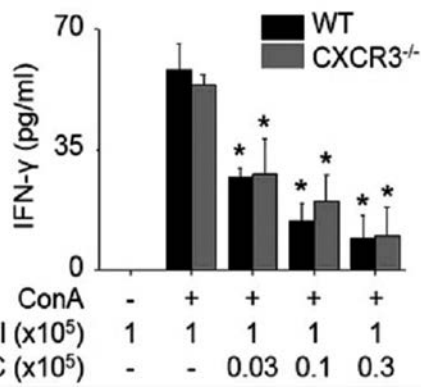
【図 3 b】



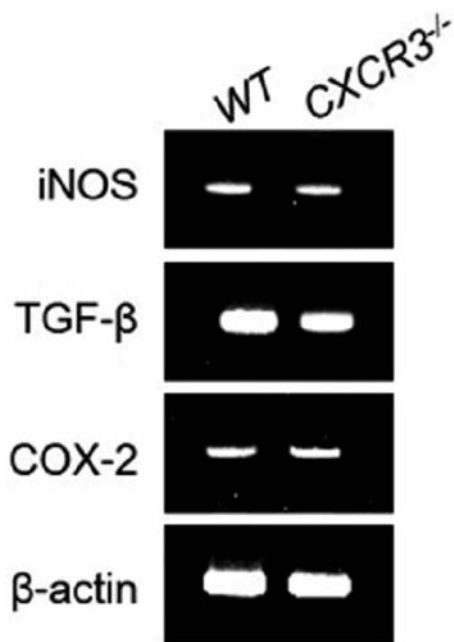
【図 3 d】



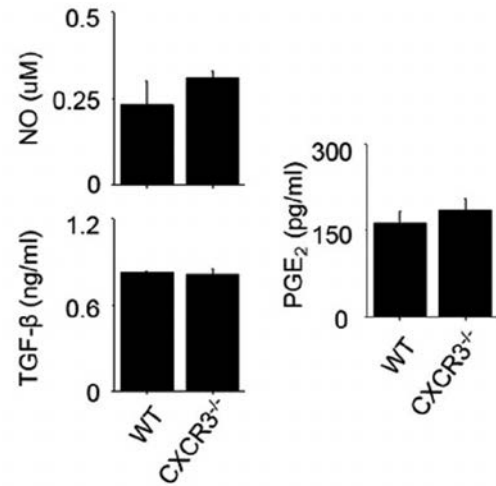
【図 3 c】



【図 3 e】



【図 3 f】



【配列表】

2021527835000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/007121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6883(2018.01)i, G01N 33/68(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/6883; A61K 35/12; A61K 35/28; A61K 39/395; G01N 33/68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: mesenchymal stem cell (MSC), autoimmune disease, CXCR3, systemic lupus erythematosus (SLE), availability, CXCL10, expression		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COLLINS, E. et al. Hematopoietic and mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of refractory systemic lupus erythematosus-where are we now? Clin. Immunol. 2013, vol. 148, pages 328-334 See abstract; pages 330, 333; figure 1.	13-18,22,24
A		1-12,20
A	LIAO, X. et al. Chemokines and Chemokine Receptors in the Development of Lupus Nephritis. Mediators Inflamm. 2016, thesis no. 6012715, pages 1-15 See abstract; pages 1, 4, 5, 9, 10.	1-18,20,22,24
A	US 2009-0324609 A1 (LODIE, T. et al.) 31 December 2009 See the entire document.	1-18,20,22,24
A	KR 10-2015-0016117 A (CORESTEM CO., LTD.) 11 February 2015 See the entire document.	1-18,20,22,24
PX	LEE, J. H. et al. CXCR3-deficient mesenchymal stem cells fail to infiltrate into the nephritic kidney and do not ameliorate lupus symptoms in MRL ^{-lpr} mice. Lupus. Electronic publication on 23 August 2018, vol. 27, no. 11, pages 1854-1859 See the entire document.	1-18,20,22,24
☐ 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 "I" 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 24 SEPTEMBER 2019 (24.09.2019)		Date of mailing of the international search report 24 SEPTEMBER 2019 (24.09.2019)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/007121

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.: **19, 21, 23**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 19, 21, and 23 pertain to a method for treatment of the human body, including a step for direct treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
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:

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.:

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.

PCT/KR2019/007121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0324609 A1	31/12/2009	AU 2008-287063 A1	19/02/2009
		AU 2008-287063 B2	24/10/2013
		CA 2697265 A1	19/02/2009
		EP 2185689 A2	19/05/2010
		EP 2578677 A1	10/04/2013
		EP 2581441 A1	17/04/2013
		US 2012-0121611 A1	17/05/2012
		US 8481022 B2	09/07/2013
		WO 2009-023566 A2	19/02/2009
		WO 2009-023566 A3	07/05/2009
KR 10-2015-0016117 A	11/02/2015	KR 10-2016-0030387 A	17/03/2016
		WO 2016-017863 A1	04/02/2016

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2019/007121
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6883(2018.01)i, G01N 33/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6883; A61K 35/12; A61K 35/28; A61K 39/395; G01N 33/68 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eCOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC), 자가면역질환(autoimmune disease), CXCR3, 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE), 유효성, CXCL10, 발현		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	COLLINS, B. 등, 'Hematopoietic and mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of refractory systemic lupus erythematosus - where are we now?', Clin. Immunol., 2013, 148권, 페이지 328-334 초록; 페이지 330, 333; 도면 1 참조.	13-18, 22, 24
A		1-12, 20
A	LIAO, X. 등, 'Chemokines and Chemokine Receptors in the Development of Lupus Nephritis', Mediators Inflamm., 2016, 논문번호 6012715, 페이지 1-15 초록; 페이지 1, 4, 5, 9, 10 참조.	1-18, 20, 22, 24
A	US 2009-0324609 A1 (LODIE, T. 등) 2009.12.31 전체 문헌 참조.	1-18, 20, 22, 24
A	KR 10-2015-0016117 A (코아스템(주)) 2015.02.11 전체 문헌 참조.	1-18, 20, 22, 24
PX	LEE, J. H. 등, 'CXCR3-deficient mesenchymal stem cells fail to infiltrate into the nephritic kidney and do not ameliorate lupus symptoms in MRL.Faslp mice', Lupus, 전자공개 2018.08.23, 27권, 11호, 페이지 1854-1859 전체 문헌 참조.	1-18, 20, 22, 24
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 국제출원일 이후 "X"에 공개된 선행문헌 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2019년 09월 24일 (24.09.2019)		국제조사보고서 발송일 2019년 09월 24일 (24.09.2019)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2019/007121

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 19, 21, 23
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 19, 21, 23은 인체에 대한 직접적인 처치 단계를 포함하는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/007121

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2009-0324609 A1	2009/12/31	AU 2008-287063 A1 AU 2008-287063 B2 CA 2697265 A1 EP 2185689 A2 EP 2578677 A1 EP 2581441 A1 US 2012-0121611 A1 US 8481022 B2 WO 2009-023566 A2 WO 2009-023566 A3	2009/02/19 2013/10/24 2009/02/19 2010/05/19 2013/04/10 2013/04/17 2012/05/17 2013/07/09 2009/02/19 2009/05/07
KR 10-2015-0016117 A	2015/02/11	KR 10-2016-0030387 A WO 2016-017863 A1	2016/03/17 2016/02/04

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/6881	(2018.01)	C 1 2 N	5/0775	4 C 0 8 7	
C 1 2 Q	1/686	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6881	Z	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	C 1 2 Q	1/686	Z	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		
A 6 1 P	17/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/14		
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/06		
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	1/02		
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	5/14		
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00		
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/06		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/04		
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	29/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/08		
A 6 1 P	5/16	(2006.01)	A 6 1 P	29/02		
A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 P	5/16		
A 6 1 K	35/32	(2015.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/28		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	35/32		
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
			A 6 1 K	39/395	D	
			A 6 1 K	39/395	U	
			A 6 1 K	38/17		

(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, 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, TZ

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人 100121728

弁理士 井関 勝守

(74)代理人 100165803

弁理士 金子 修平

(74)代理人 100170900

弁理士 大西 渉

(72)発明者 ギム ギョンスク

大韓民国 0 2 8 3 8 ソウル ソンブク - グ ソンブク - ロ 1 7 6、1 0 6 - 1 0 8

(72)発明者 ハン サンベ

大韓民国 2 8 6 9 2 チュンチョンブク - ド チョンジュ - シ ソウォン - グ アントム - ロ
4 7 ボン - ギル 1 7

F ターム(参考) 2G045 AA25 DA36 FB02 FB03

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS34 QX01

4B065 AA90X AC14 BA22 CA24 CA44

4C084 AA02 AA17 BA44 DA45 NA14 ZA021 ZA081 ZA361 ZA551 ZA591

ZA661 ZA671 ZA891 ZA921 ZA941 ZA961 ZB051 ZB081 ZB111 ZB131

ZB151 ZC061 ZC412

4C085 AA13 AA14 BB11 CC05 DD62 EE01 GG01 GG03 GG04 GG05

GG08 GG10

4C087 AA01 AA02 AA03 BB46 BB64 BB65 CA04 NA14 ZA02 ZA08

ZA36 ZA55 ZA59 ZA66 ZA67 ZA89 ZA92 ZA94 ZA96 ZB05

ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZC06