

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5364086号  
(P5364086)

(45) 発行日 平成25年12月11日(2013.12.11)

(24) 登録日 平成25年9月13日(2013.9.13)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/53 (2006.01)** GO 1 N 33/53 Z N A D  
**CO 7 K 14/78 (2006.01)** CO 7 K 14/78  
**CO 7 K 16/18 (2006.01)** CO 7 K 16/18

請求項の数 7 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2010-500876 (P2010-500876)	(73) 特許権者	509245751
(86) (22) 出願日	平成20年3月27日 (2008. 3. 27)		アナマル メディカル アクチボラゲット
(65) 公表番号	特表2010-522880 (P2010-522880A)		スウェーデン国 エス - 4 1 1 3 6
(43) 公表日	平成22年7月8日 (2010. 7. 8)		イエーテボリ、クングスポーツサベニェ
(86) 国際出願番号	PCT/SE2008/050341		ン 2 2
(87) 国際公開番号	W02008/118090	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開日	平成20年10月2日 (2008. 10. 2)		特許業務法人浅村特許事務所
審査請求日	平成23年3月18日 (2011. 3. 18)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	11/728, 857		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成19年3月27日 (2007. 3. 27)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変形性関節症と関節リウマチ及び無病状態とを鑑別するための軟骨中間層タンパク質2 C 1及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軟骨中間層タンパク質 2 C 1 (配列番号 N ° 1) 又はその断片の濃度を試料において測定することを含む、変形性関節症と、関節リウマチ及び無病状態とを試料において鑑別するための方法。

【請求項 2】

前記試料が、滑液、血液、血漿、血清及び尿からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

配列番号 1 又はその断片からなる、変形性関節症と、関節リウマチ及び無病状態とを鑑別するためのペプチド。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のペプチド又はその断片との免疫反応性のある抗体。

【請求項 5】

請求項 3 に記載のペプチド又はその断片について、前記ペプチドに対して免疫反応性のある抗体を使用して試料を分析することを含む、変形性関節症と、関節リウマチ及び無病状態とを鑑別するためのアッセイ。

【請求項 6】

酵素結合免疫アッセイである、請求項 5 に記載のアッセイ。

【請求項 7】

10

20

a) 前記ペプチド又はその断片に対して免疫反応性のある抗体、及びb) アッセイを行う際に使用するための説明書を含む、請求項1又は2に記載の、変形性関節症、関節リウマチ及び無病状態の相互間を検出又は検出区別するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、変形性関節症(OA)の評価に役立つ方法に関する。本方法は、特に、変形性関節症の有無を評価する際に使用される。本方法は、例えば、生化学的マーカーを分析することによって実施され、体液中のヒト軟骨中間層タンパク質2(CILP-2)の濃度を試料において測定すること及び決定した濃度と変形性関節症の有無とを相関させることを含む。より具体的には、本発明は、N末端部分又は軟骨中間層タンパク質2C1又はその断片に関する。本発明はまた、変形性関節症と関節リウマチ(RA)及び無病状態とを鑑別するための、診断及び予測のアッセイの開発を記載する。

10

【背景技術】

【0002】

関節炎は、体内の関節の健康に影響を及ぼす状態の一群であり、これには、自己免疫疾患である関節リウマチ及び乾癬性関節炎、関節感染症に起因する敗血症性関節炎、並びにより一般的な変形性関節症が含まれる。自己免疫疾患とは異なり、変形性関節症は、主として高齢者を侵し、関節軟骨が変性することによって生じる。

【0003】

20

変形性関節症は、個体群の大部分を侵す関節炎のうちで最も一般的な形である。変形性関節症は、殆どいずれの関節でも侵す可能性があるが、手、膝、股関節及び脊椎を最も高い頻度で侵す。一般的な症状には、患部関節の、疼痛、こわばり、関節運動の消失及び変形が含まれる。それは、変性関節疾患又は「消耗性」関節炎と呼ばれることが多い。変形性関節症は外傷によって突然生じることがあるが、その発現は概して漸進的である。すなわち、加齢が軟骨の破壊を引き起こし、疼痛は、初期段階では安静にすることによって軽減され得るが、次第により重症になる。夜間のズキズキする鈍痛が特徴的であり、筋肉の脱力又は衰退を伴うことがある。症状は通常、50歳を過ぎると出現し、徐々に進行する。関節痛から始まり、その状態が進行し、最終的に関節が変形し、運動が制限されるようになる。軟骨が破壊されると、骨が露出した状態になり、歩行を変化させる。本疾患のその後の段階は、炎症の構成部分を有することが示されており、軟骨における過程が、この炎症を刺激することに関与している可能性がある。その状態は、関節にかかる過剰な又は異常な負荷によって開始されるとみられており、過体重、悪い姿勢、仕事による反復的な負担、外傷、スポーツ外傷又はこれらの因子の組合せがリスクを増加させることが知られている。

30

【0004】

変形性関節症はまた、組織構造の新しい産生を含み、これは、軟骨内骨形成によって形成された新しい構造物である、いわゆる骨棘の形で特に明白である。機械的因子が、両方の疾患の開始及び進行に関与しているように思われるが、部分的には、この疾患の初期段階にそれらを識別することが可能な診断手法に乏しいため、特定の事象については殆ど知られていない。患者は通常、疼痛及び関節機能不全のため、疾患発症後に遅れて治療を求め、その時には、軟骨破壊が既に極めて進行している。

40

【0005】

今日、変形性関節症の決定的な診断を可能にする、唯一の徴候、症状又は検査結果は全くない。その代わりに、診断は、変形性関節症の特徴的な徴候及び症状の存在、並びに臨床検査及びX線の結果、米国リウマチ学会(ACR)によって定められた基準を含めたいくつかの因子を考慮することに基づいている。

【0006】

X線写真は通常、所見が非特異的であっても、変形性関節症の診断を確認することができる。本疾患の主要なX線写真の特徴は、関節間隙の消失及び新骨形成又は骨棘の存在で

50

ある。この疾患の病理又はX線写真の検査所見を有する関節でさえ無症候性のままである可能性があるというように、関節痛と変形性関節症のX線写真の特徴との関連は、それほど密接ではない。OAにおいて、特に膝に関して、軟骨破壊の度合いを写し出すためにX線撮影法を使用することの別の欠点は、関節間隙を正しく測定するために、X線が正確な角度を有する必要があるということである。X線を使用する診断は、外傷の発現後、数年間使用されるが、軟骨中間層タンパク質2C1及びその断片などのバイオマーカーは、適切な診断のために、かなり早い時期に使用することができる。

#### 【0007】

変形性関節症の進行性の組織破壊における基礎的な過程が何なのかは明らかではないが、増大したタンパク質分解活性に起因する、主要組織の巨大分子の破壊という明らかな事象が存在する。この進行性の組織破壊における初期事象は、アグリカン（軟骨の主要な構成成分であるプロテオグリカン）の分解であり、分子に沿った5つの特定部位が、いわゆるアグリカナゼ（ADAMTS-4及び5）によって開裂され得ることが明らかにされている。しかし、アグリカンの正常濃度は、例えば、典型的な部位での同ADAMTS酵素による分子の開裂を伴う過程において、軟骨にかかる変化した機械的負荷に順応する。軟骨オリゴママトリックスタンパク質（COMP）などの主要な分子を分解する特定のコラゲナーゼ及び他の酵素によってなし遂げられる、コラーゲンの破砕が存在する。

#### 【0008】

変形性関節症の過程において、産生される断片のうちのあるものは、もはや組織中に留保されず、周囲の体液中に放出され、最終的に循環するに至る可能性がある。新しい技術は、体液中のこのような断片を、組織破壊に至る活性過程の指標として測定することに基づいている。この分子マーカー技術は、新しい診断手法の可能性を提供する。これらは、現在使用されているアプローチを用いてなし得るよりも、組織破壊におけるかなり初期の事象を検出する潜在性を有する。滑液中に放出されている循環中のCOMP断片の濃度が増加し、最終的に血液に到達する場合、それらを、X線画像によって観察されるような関節軟骨の破壊に至る過程の、予測指標として使用できることが認められている。変形性関節症及び関節リウマチの、疾患における過程は異なるが、血清COMP濃度が両方の症例における予測値を有しているように思われる。

#### 【0009】

体液中で変化したCOMP濃度の意義を評価する際の1つの限界は、検出されたCOMPの大部分が、正常な代謝回転から生じるものなのか、又は疾患の進行から生じるものなのかを区別することの難しさである。利用されている他の指標には、II型コラーゲン（CTX-IIと称される）の開裂時に放出されるC末端テロペプチドが含まれる。他のアッセイは、II型コラーゲンがコラゲナーゼによって開裂される時に形成される、本来のポリペプチド鎖内の新しい両末端を直接測定する。修復相に向けられたアッセイは、プロコラーゲンがコラーゲン原線維形成のために処理される際の、II型コラーゲンのC末端プロペプチド（CP-II）の放出を利用している。このプロペプチドは明らかに、軟骨中に留保されない。負に帯電したコンドロイチン硫酸鎖を含む主要な断片は、循環するに至らずに、主としてリンパ節に排出されるように思われるため、アグリカン断片の放出を測定するための手法は、使用を限定している（Fraser、Heinegard、Saxne、未公表のデータ）。しかし、初期関節リウマチを有する患者由来の滑液におけるアグリカン断片の測定は、10年間にわたって、より広汎な軟骨破壊を発症しているそれらの患者を識別することを証明している（1）。

#### 【0010】

これらすべてのマーカーの1つの明白な欠点は、所与の関節疾患に対して特異性がなく、正常な個体由来の試料と関節疾患を有する個体由来の試料との間で、測定された濃度が重なることである。さらに、これらの指標のいずれを用いても、関節リウマチを有する症例と変形性関節症を有する症例との間に認められる相違が全くないか、又は殆どない。一部の患者のみが、それらと正常な個体とをはっきり区別するほど十分に高い値を示す（2）。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 1 】

1つの問題点は、定期的な及び頻繁な負荷に応答した、組織構造分子の持続的な代謝回転が存在することである。このことが、疲労した組織要素を除去することを含めた、新しい要求に組織機能を順応させる働きをする。この代謝回転の1つの結末は、これらの正常な開裂によって生成される断片の持続的な放出が存在することである。今日使用されている、断片の分子指標としてのアッセイにおいて、正常な代謝回転によって生成されたものと、病理学的過程によって生成されたものとの間の区別は殆どない。したがって、増大した病理学的分子過程を検出する能力を妨害する重大な背景が存在する。しかし、II型コラーゲン（関節軟骨中に豊富なコラーゲン）の破壊生成物の中には、仮にこの過程が同一酵素によって誘発され得るとしても、正常な事象と病理学的な事象とをよりはっきり区別

10

## 【 0 0 1 2 】

本明細書において使用される場合、タンパク質、ここでは軟骨中間層タンパク質前駆体は、それぞれCILP-1及びCILP-2と称される。本発明者らが研究しているN末端部分は、軟骨中間層タンパク質2C1と称され、軟骨中間層タンパク質2C2とは異なる。

## 【 0 0 1 3 】

軟骨中間層タンパク質（CILP）は、分泌された大きな糖タンパク質（3～6）が軟骨の足場（7）において役割を果たすと考えられており、これはヌクレオシド三リン酸ピロホスホヒドロラーゼ〔NTPPH〕活性を有することも主張されている（8～11）。CILPの発現は、主として軟骨に限定されているように思われる（3、4、9、11、12）。CILPタンパク質の量は、加齢したヒト関節軟骨において増加し、CILPは、その発現が初期の変形性関節症において顕著に上方調節されるようになる、ほんの少数の軟骨マトリックスタンパク質の1つである（4）。正常培養ブタ軟骨細胞において、形質転換成長因子1（TGF1）はCILP発現を誘発するが、インスリン様成長因子1（IGF-1）はCILP発現を抑制する（10）。最初に検出されたCILPは、今では軟骨中間層タンパク質1C1と称されている（UniProtKB/Swiss-Prot登録番号O75339）。

20

30

## 【 0 0 1 4 】

タンパク質のヌクレオチド配列の中で、軟骨中間層タンパク質2（CILP-2は、Genbank配列データバンクに預けられた（受入れ番号AF542080、2002年）。タンパク質CILP-2の最初の研究は2003年（13）に出現し、この時、それはヌクレオチドピロホスファターゼホスホジエステラーゼ（NPP）活性を示さないことが見出された（13）。

## 【 0 0 1 5 】

CILP-2は、CILP-1に対して50%の相同性を有し、データ（Lorenzo及びHeinegard、未公表）は、それは同様に開裂されて、相当する軟骨中間層タンパク質2C1及び軟骨中間層タンパク質2C2になることを示している（UniProtKB/Swiss-Prot登録番号Q8IUL8）。プロテオミクスによるアプローチから、両方のタンパク質は、軟骨抽出物中に見出されている（Onnerfjord及びHeinegard、未公表）。

40

## 【 0 0 1 6 】

最近の研究では、本発明者らは、変形性関節症の初期及び後期の両方において、COMP、フィブロネクチン及び同時に、本発明者らが特徴付け、CILPと命名し、今では軟骨中間層タンパク質1C1と称されている新しいタンパク質の産生の上方調節を明らかにした（3、4、16）。

## 【 0 0 1 7 】

ヒトCILP-2の、アミノ酸21-709（配列番号1）をカバーするペプチドは、

50

変形性関節症と関節リウマチ及び無病状態とを鑑別するために使用することが可能なマーカーであることが、驚いたことに、今では本特許出願の発明者らによって明らかにされている。

【0018】

複数の研究は、C I L P (軟骨中間層タンパク質1 C 1)が、変形性関節症を有する患者における自己抗原であるとしている(14、15)。軟骨中間層タンパク質2 C 1が変形性関節症において変化し得ることを示すことで知られている研究は全くない。軟骨中間層タンパク質2 C 1又はその断片が変形性関節症の診断に使用され得ることを明らかにしている又は示唆している論文又は特許を、全く見出すことができなかった。

【0019】

D uらによる2005年の研究(14)は、膝変形性関節症を有する患者の小部分が、C I L P (軟骨中間層タンパク質1 C 1)に対する自己抗体を有するとした。抗体は、変形性関節症患者136例中25例にのみ検出された。同様に、T s u r u h aらは2001年に(7)、C I L P (軟骨中間層タンパク質1 C 1)の異なる領域に対するわずか8~10.5%の抗体を検出した。本発明の主題であるタンパク質である軟骨中間層タンパク質2 C 1又はその断片に対する抗体を示すことを報告されている研究は全くない。

【0020】

I n c y t eに譲渡された米国特許第6124095号及び米国特許第6251389号には、C I L P - 2及びC I L P - 2をコード化するポリヌクレオチドが開示されている。これらの特許では、このタンパク質はヒトヌクレオチドピロホスホヒドロラーゼ-2 (N T P P H - 2)と称されているが、N T P P H - 2配列はC I L P - 2と全く同じものである。彼らは、リウマチ及び変形性関節症の滑液包におけるN T P P H - 2の発現に気付いた。この特許は、変形性関節症患者の選択的な識別にN T P P H - 2を使用する可能性について記載していない。同出願人は、C I L P - 1 (N T P P H - 1)及びN T P P H - 1をコード化するポリヌクレオチドに関する、取得特許(米国特許第5876963号)を有する。

【0021】

D E 1 0 3 2 8 0 3 3 (S . B l a e s s)は、変形性関節症及び関節リウマチと関連しているDNA配列を搭載するチップ、例えば、診断、モニタリング及び医薬品開発のためのチップを記載している。彼らは、軟骨中間層タンパク質2 C 1に言及していない。

【0022】

W O 0 3 / 0 5 4 1 6 6 (I n c y t e)は、個体の、好ましくは変形性関節症患者の、関節間隙の狭細及び/又は骨棘発生及び/又は関節痛への罹病性を決定する方法であって、言及されている多くのタンパク質のうちの1つがC I L Pであるタンパク質をコード化するポリヌクレオチドにおいて、少なくとも1つの多型性を個体が有するかどうかを識別することを含む方法を記載している。しかし、彼らは、軟骨中間層タンパク質2 C 1に言及していない。

【0023】

W O 0 2 / 0 9 5 4 1 5 及びW O 0 1 / 3 8 8 7 2 (O s t e o m e t e r B i o t e c h)は両方とも、試料中の異性化タンパク質若しくは場合によって転化されたタンパク質又はタンパク質の断片を検出することを含む、変形性関節症又は関節リウマチの重症度の診断のためのアッセイを記載している。W O 0 2 / 0 9 5 4 1 5 に記載の断片も、W O 0 1 / 3 8 8 7 2 のタンパク質も、軟骨中間層タンパク質2 C 1由来ではない。

【0024】

W O 0 1 / 2 0 0 1 8 (カリフォルニア大学)は、生物試料中の、変化したミトコンドリア機能に関する少なくとも1つの指標の濃度、例えばN T P P H濃度を、対照試料と比較することを含む、関節疾患、例えば変形性関節症に対するリスクを識別する方法を記載している。

【0025】

変形性関節症の適切な診断は、現在では進行した疾患においてのみ可能であり、X線及

10

20

30

40

50

び臨床試験に依存している。関節リウマチの場合には、関節軟骨の破壊は、進行した段階で、X線によって決定することしかできない。

【0026】

RAは、その初期段階に非常に急速に悪化する可能性があり、24箇月ほどの短い期間に、関節に重篤な障害が生じることがある。TNF-活性を遮断するなどの、RAに対する現代の有効な治療が初期に開始される場合には、症状を軽減することができ、関節破壊の悪化を遅延させ、初期の身体障害を避けることができる。

【0027】

変形性関節症の治療を変更することを文書で証明された疾患は全くない。現在では、治癒は得られず、治療は疼痛を軽減することに集中している。一般的な治療には、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)の使用が含まれ、これらは疼痛を軽減するために使用されることが多い。コンドロイチン及びグルコサミンなどの化合物は、軟骨自体を強化すると考えられているが、十分に管理された研究は、依然として重要な関心事であり続けている。

10

【0028】

重症例では、多くの場合、関節置換が必要になる。少数例では、関節が溶解していることもある。この手法は、疼痛を停止するが、結果として関節機能を永久的に失うことになる。完全に発症した変形性関節症に対して、まだ使用されていない別の治療には、培養自己軟骨細胞の移植が含まれる。この状態が矯正及び/又は治療されずに続く場合、関節は破壊され、全人工関節を用いる大置換手術又は身体障害に至る。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0029】

したがって、初期段階の疾患発症を停止し得る新しい治療計画を導入するために、新しく、早く且つ正確な診断が、不可欠であり、飛躍的な進歩をもたらすことになる。こういった理由で、本出願の発明者らは、発症しつつある変形性関節症のための、並びに変形性関節症と関節リウマチ及び正常関節とを鑑別するための指標として使用することができるアッセイの開発を試みた。

【0030】

初期の実験において、発明者らは、軟骨中間層タンパク質1C1は、初期及び後期の段階の両方を含めた変形性関節症において上方調節されるが、変形性関節症を有する患者由来の滑液中では顕著な増加を示さず、関節リウマチを有する患者由来の滑液中で有意に異なっているとはいえないことを明らかにすることができた。軟骨中間層タンパク質2C1についてのアッセイを開発し始めた時、驚いたことに、本発明者らは、このタンパク質が、変形性関節症において予期していない独特の高い濃度を示す指標としての働きをすることを明らかにした。血清中及び滑液中の濃度は、非常に高く、関節リウマチ由来の試料と正常な個体由来の試料との重なりを全く示さない。組織から放出された任意のタンパク質についてのアッセイが、異なる関節疾患カテゴリーを代表する試料間のこのような違いを示しているのは、これが初めてである。本明細書において、本発明は、診断の確定可能前及び確定可能時に、変形性関節症の過程を検出するための、新規な診断及び予測のアッセイを提供する。他の目的及び利点は、以下の開示及び添付の特許請求の範囲から、より完全に明らかとなる。

30

【課題を解決するための手段】

【0031】

本発明は、軟骨中間層タンパク質2C1タンパク質又はその断片の濃度を試料において測定することを含む、変形性関節症と関節リウマチ及び無病状態とを試料において鑑別するための方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】実施例4に記載されている患者由来の血清の試料を示すグラフである。試料は、

50

軟骨中間層タンパク質 2 C 1 のための E L I S A 法によって分析された。

【図 2】実施例 4 に記載されている患者由来の膝関節滑液の試料を示すグラフである。試料は、軟骨中間層タンパク質 2 C 1 のための E L I S A 法によって分析された。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 3 】

本明細書において、本発明に関する研究は、軟骨中間層タンパク質 1 C 1 についての初期のデータに基づいており、軟骨中間層タンパク質 1 C 1 とは、本発明者らが、変形性関節症において主要な増加を示す少数のタンパク質の 1 つとして識別したものである。組織から精製したタンパク質に対して高められた本発明者らの抗体を用いる、本発明者らの最初の試みは有望であり、このタンパク質が変形性関節症患者由来の滑液中に放出されること、及び最も高い濃度が変形性関節症患者由来の試料中で見出されることを示した。

10

【 0 0 3 4 】

E B N A 2 9 3 線維芽細胞中に産生された組換え軟骨中間層タンパク質 1 C 1 を用いる研究は、困惑したことに、E L I S A における被覆抗原としてのこの純粋なタンパク質が、滑液試料の場合に良好な阻害濃度をもたらさないことを明らかにした。この時点では、軟骨中間層タンパク質 2 はデータベースに出現しており、本発明者らは、本発明者らが調製中のこのタンパク質に対する抗体の汚染が存在するのではないかと疑った。それ故、本発明者らは、軟骨中間層タンパク質 2 C 1 に対する特定の抗体を開発し、今ではこれを、滑液及び血清における、このタンパク質の断片についてのアッセイを開発するために使用している。このアッセイは、非常に有望であることが判明し、正常な個体由来の血清試料、並びに関節リウマチ及び変形性関節症を有する患者由来の血清試料の分析によって、図 1 に描いた結果が得られた。

20

【 0 0 3 5 】

結果は、軟骨中間層タンパク質 2 C 1 濃度が、関節リウマチ及び正常な個体の両方と比較して、変形性関節症ではるかに高く、重なりが全くないことを示した。アッセイが、組織から放出された任意のタンパク質について、異なる関節疾患カテゴリーを代表する試料間のこのような違いを示しているのは、これが初めてである。

【 0 0 3 6 】

A C R 基準に従って臨床的に確定された関節リウマチを有する患者 1 2 例（すべて膝関節炎を有する）、臨床的及び X 線写真の A C R 基準に従って臨床的に確定された膝関節変形性関節症を有する患者 1 2 例由来の血清及び滑液試料、並びに供血者由来の正常な対照血清試料 1 2 例を、確立された E L I S A 手法を用いて分析した。中心となる観察は、軟骨中間層タンパク質 2 C 1 又はその断片の濃度が、変形性関節症を有する患者由来の試料中で明らかにより高く、正常な個体における濃度への有意な重なりが全くなく、正常な個体における濃度はまた、関節リウマチを有する患者由来の試料中の濃度に非常に類似した濃度を示したことであった。変形性関節症を有する患者は、より広範囲のかなり高い濃度を示しており、このことは、軟骨中間層タンパク質 2 C 1 の増加した濃度の放出が、この群の共通の特徴であることを実証した。

30

【 0 0 3 7 】

結果は、関節を侵す異なる状態間で、分子マーカー濃度の独特な違いを示す。興味深いことに、豊富なデータは、血清中 C O M P 濃度が、関節リウマチ及び変形性関節症の両方において、高い濃度を示すことを明らかにしている。それ故、C O M P と軟骨中間層タンパク質 2 C 1 との間の比は、特に、軟骨中間層タンパク質 2 C 1 又はその断片の正常以下の濃度を示すように思われる患者のサブグループにおいて、関節リウマチを有する個体と正常な個体とを区別する。

40

【 0 0 3 8 】

結果は、新規な分子マーカーが、変形性関節症を有する状態の診断に役立つ潜在性を有することを示す。軟骨中間層タンパク質 2 C 1 の濃度は、正常な個体及び関節リウマチを有する患者においてよりも、明らかに高い。正常な個体及び変形性関節症を有する個体における濃度間の違いは、軟骨中間層タンパク質 2 C 1 のアッセイが、存在する疾患活性の

50

指標としても役立つことを示している。患者の試料における広範囲の値は、濃度が過程の強さに相関していることを示す。本発明の方法によって分析することができる試料には、滑液、血液、血漿、血清及び尿が含まれる。

【0039】

本発明はまた、アミノ酸配列（配列番号1）及び/又はその断片を含むペプチドとの免疫反応性のある抗体、並びにアッセイを行う際に使用するための説明書を含む検査キットに関する。

【0040】

（実施例1）

抗原及び抗血清の調製

ヒトCILP-2（GeneBank受入れ番号Q8IUL8）の、アミノ酸21-709（配列番号1）の範囲内の合成ペプチドを、免疫原として使用した。追加のシステイン残基をアミノ末端に加え、異なる基質に選択的なカップリングをさせた。ペプチド配列（配列1）は、標準プロトコルに従って、ポリクローナル抗体を生成するために、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）にシステインを加えることによって、そのN末端において結合した後、免疫原として使用した。ヒト軟骨中間層タンパク質2C1の、アミノ酸21-709の範囲内の任意の断片を免疫原として使用することができた。

【0041】

市販源（Innovagen AB, Lund, Sweden）を、ウサギへの注射及び抗血清の生成を含めた、ペプチドの合成、担体への結合、免疫用抗原の調製に使用した。

【0042】

（実施例2）

粗抗血清からの抗ペプチド抗体の精製

生じた抗血清を、固定化した軟骨中間層タンパク質2C1ペプチド（Innovagen AB, Lund, Sweden）を有するカラム上でアフィニティー精製した。カラム（1.5mlゲル）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS、0.1Mリン酸緩衝液、150mM NaCl、pH7.5）で平衡化し、血清5mlを適用し、回転させながら室温で1時間インキュベートし、次いで攪拌せずに1時間さらにインキュベートした。カラムを、1M NaClを含むPBS15mlで洗浄し、次いで同10mlで洗浄した。カラムを1.5mlの100mMグリシンpH2.7で段階的に溶出させた。10画分を採取し、直ちに50µlの1M Tris pH9.5で中和した。最も高い吸光度を有する画分を貯留し、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBSに対して透析した。透析後、体積を測定し、IgGの濃度を、280nmでのその吸光度によって決定した。アフィニティー精製した抗体を、200µlアリコートの状態で-20にて凍結保存し、これをすべてのアッセイに使用した。

【0043】

（実施例3）

軟骨中間層タンパク質2C1についての競合酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）

体液中のヒト軟骨中間層タンパク質2C1を測定するために、特定の競合ELISAを開発した。

1. ペプチドのビオチニル化：ペプチドを、その末端システインを介して、EZ-Link（登録商標）Maleimide PEO<sub>2</sub>-Biotinで、製造業者（PIERCE）によって記載されているようにビオチニル化した。

2. 抗体の前処理：アフィニティー精製したペプチド抗体を、5% n, n-ジメチルホルムアミド（Sigma-Aldrich）を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、pH7.4中、1:50に希釈した。室温で1時間のインキュベーション後、抗体を10mMリン酸塩（NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>）pH7.5中4% Tritonで1:2000に希釈した。

3. 標準及び試料の前処理：0.5%ウシ血清アルブミン（BSA、Sigma-Al

10

20

30

40

50

d r i c h ) を含む、0 . 1 M 塩化ナトリウム、0 . 0 5 M リン酸ナトリウム p H 7 . 5 中、1 % ( w / v ) ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ( S D B S 、 S i g m a - A l d r i c h ) 中の標準 ( 1 から 1 2 5 n g / m l まで ) 及び B S A を含まない 1 % ( w / v ) S D B S 溶液中の滑液又は血清の適切な希釈溶液を、室温で一晩インキュベートした。

4 . アッセイ : 9 6 - ウェルマイクロタイタープレート ( N u n c - I m m u n o p l a t e s 、 M a x i s o r p 、 N u n c I n t e r m e d L t d 、 C o p e n h a g e n 、 D e n m a r k ) を、P B S p H 7 . 4 中ストレプトアビジン ( I m m u n o P u r e ( 登録商標 ) S t r e p t a v i d i n 、 P I E R C E ) 5 0  $\mu$  l で、湿式チャンパー内で室温にて一晩コートした。プレートを 0 . 1 5 M 塩化ナトリウム及び 0 . 0 5 % ( w / v ) T w e e n 2 0 ですすいだ後、ポリスチレン表面の遊離結合部位を、P B S 、 p H 7 . 4 中 2 m g / m l ウシ血清アルブミン ( S i g m a - A l d r i c h ) 8 0  $\mu$  l で、室温にて 1 時間ブロックした。次いで、1 : 1 0 0 0 0 に希釈したビオチニル化ペプチドを加え、室温で 1 時間インキュベートした。

10

#### 【 0 0 4 4 】

前処理した標準 ( 1 から 1 2 5 n g / m l まで ) 及び滑液試料又は血清試料 ( 通常の穿刺によって得られたもの ) 3 0 マイクロリットルを、希釈した抗体 3 0  $\mu$  l と混合した。室温で 1 時間のプレインキュベーション後、混合物 5 0  $\mu$  l を、マイクロタイタープレートのコートしたウェルに加え、室温で 1 時間さらにインキュベートした。プレートを上記のようにすすぎ、2 m g / m l の B S A を含む 0 . 1 M 塩化ナトリウム、0 . 0 5 M リン酸ナトリウム、0 . 0 5 % T w e e n 2 0 、 p H 7 . 5 中、アルカリホスファターゼ ( D A K O A / S 、 D e n m a r k ) と結合したウサギ抗ブタ I g G の希釈溶液 5 0  $\mu$  l を加えることによって、結合抗体を検出した。室温で 1 時間のインキュベーション後、プレートを上記のようにすすぎ、基質 5 0  $\mu$  l ( 0 . 5 M M g C l <sub>2</sub> を含む 1 M ジエタノールアミン p H 9 . 8 中、1 m g / m l リン酸 p - ニトロフェニル ) を加えた。

20

#### 【 0 0 4 5 】

各試料及び標準の吸光度を、マイクロプレートリーダー ( E x p e r t 9 6 、 A s y s H i t e c h 、 A u s t r i a ) を用いて、4 0 5 n m で 2 重に測定した。M i k r o w i n 2 0 0 ソフトウェアプログラム ( A s y s H i t e c h 、 A u s t r i a ) を使用して、検量線をプロットし、分析した試料中の C I L P - 2 の含量を算出した。

30

#### 【 0 0 4 6 】

##### ( 実施例 4 )

##### 研究デザイン

A C R 基準に従って臨床的に確定された膝関節の関節リウマチを有する患者 1 2 例、A C R 基準に従って臨床的に確定された膝関節変形性関節症を有する患者 1 2 例及び供血者由来の正常な対照血清試料 1 2 例を、確立された E L I S A 手法を用いて分析し、結果を図 1 に示した。

##### ( 参考文献 )

## REFERENCES

1. Saxne T, Wollheim F, Pettersson H, Heinegård D. Brit. 滑液中のプロテオグリカン濃度: 関節リウマチにおける将来の軟骨破壊の予測材料。Med. J. (1987), 295, 1447-1448.)
2. Lindqvist E, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegård D, Saxne T. Ann Rheum Dis. 関節リウマチにおける関節損傷の実験室予測マーカー。 (2005) 64, 196-201. 10
3. Lorenzo P, Neame P, Sommarin Y, Heinegård D. 新規な軟骨タンパク質 (CILP) のクローニング及び推定アミノ酸配列がヌクレオチドピロホスホヒドロラーゼを含む代用形を識別する。J Biol Chem 1998;273:23469-75.
4. Lorenzo P, Bayliss MT, Heinegård D: ヒト関節軟骨の中間域に存在する新規な軟骨タンパク質 (CILP) が年齢に伴って増加する。J Biol Chem 1998;273:23463-8. 20
5. Lorenzo P, Aman P, Sommarin Y, Heinegård D. ヒトCILP遺伝子: エクソン/イントロン構成及び染色体マッピング。Matrix Biol 1999;18:445-54.
6. Nakamura I, Okawa A, Ikegawa S, Takaoka K, Nakamura Y. ヒト軟骨中間層タンパク質をコード化する遺伝子のゲノム構成、マッピング及び多型性。J Hum Genet 1999;44:203-5. 30
7. Tsuruha J, Masuko-Hongo K, Kato T, Sakata M, Nakamura H, Nishioka K. 変形性関節症及び関節リウマチを有する患者のサブセットにおける軟骨中間層タンパク質の軟骨破壊への関与。Arthritis Rheum 2001;44:838-45.
8. Masuda I, Hamada J-I, Haas A, Ryan L, McCarty D. ブタ軟骨細胞由来の小水疱に関連する独特なエクトヌクレオチドピロホスホヒドロラーゼ。J Clin Invest 1995;95:699-704. 40
9. Masuda I, Halligan BD, Barbieri JT, Haas AL, Ryan LM, McCarty DJ. ブタ軟骨細胞ヌクレオチドピロホスホヒドロラーゼの分子クローニング及び発現。Gene 1997;197:277-87.

10. Hirose J, Masuda I, Ryan LM. 軟骨中間層タンパク質/ヌクレオチドピロホスホヒドロラーゼの発現が、成長因子への応答及び加齢に伴う細胞外無機ピロリン酸塩の産生に平行して起こる。 *Arthritis Rheum* 2000;43:2703-11.

11. Masuda I, Iyama K-I, Halligan BD, Barbieri JT, Haas AL, McCarty DJ, et al. 加齢に伴う軟骨細胞ヌクレオチドピロホスホヒドロラーゼの発現の部位及び濃度における変化。 *J Bone Miner Res* 2001;16:868-75.

10

12. Johnson K, Hashimoto S, Lotz M, Pritzker K, Goding J, Terkeltaub R. ホスホジエステラーゼヌクレオチドピロホスファターゼファミリーメンバーPC-1の上方調節された発現は、膝半月板軟骨マトリックス石灰化のためのマーカー及び病原性因子である。 *Arthritis Rheum* 2001;44:1071-81.

20

13. Johnson K., Farley D., Hu S., Terkeltaub R. 軟骨細胞を発現した軟骨中間層タンパク質の2つのイソ型のうちの1つがインスリン様成長因子1アンタゴニストとして機能する。 *Arthritis Rheum* Vol. 48, No. 5, May 2003, pp 1302-1314.

14. Du H., Masuko-Hongo K., Nakamura H., Xiang Y., Bao C-D., Wang X-D.,; Chen S-L., Nishioka K., Kato T. 初期段階の膝変形性関節症を有する患者における、軟骨中間層タンパク質、YKL-39、オステオポンチン及び環状シトルリン化ペプチドに対する自己抗体の保有率:種々の自己免疫過程の検査所見。 *Rheumatology international*, (2005 Nov) Vol. 26, No. 1, pp. 35-41. Electronic Publication: 2004-09-18.

30

15. Kato Tomohiro; Xiang Yang; Nakamura Hiroshi; Nishioka Kusuki. 変形性関節症の軟骨における新生抗原。 *Current opinion in rheumatology*, (2004 Sep) Vol. 16, No. 5, pp. 604-8.

40

16. Lorenzo P, Bayliss M, Heinegård D. 初期変形性関節症における細胞外マトリックス巨大分子の変化型及び合成。 *Matrix Biol.* (2004) 23, 381-91).

## 【化 1 - 1】

## 配列表

<110> Lorenzo, Pilar Saxne, Tore Heinegård, Dick	10
<120> 変形性関節症と関節リウマチ及び無病状態とを 鑑別するための軟骨中間層パンタク質  2 C1 及びその使用	
<130> 1901	
<160> 1	20
<170> PatentIn 3.4 版	
<210> 1	
<211> 689	30
<212> PRT	
<213> ホモサピエンス	
<400> 1	40

## 【化 1 - 2】

Arg Asp Ala Thr Pro Thr Glu Glu Pro Met Ala Thr Ala Leu Gly Leu

1            5            10            15

Glu Arg Arg Ser Val Tyr Thr Gly Gln Pro Ser Pro Ala Leu Glu Asp

10

20            25            30

Trp Glu Glu Ala Ser Glu Trp Thr Ser Trp Phe Asn Val Asp His Pro

35            40            45

20

Gly Gly Asp Gly Asp Phe Glu Ser Leu Ala Ala Ile Arg Phe Tyr Tyr

50            55            60

Gly Pro Ala Arg Val Cys Pro Arg Pro Leu Ala Leu Glu Ala Arg Thr

30

65            70            75            80

Thr Asp Trp Ala Leu Pro Ser Ala Val Gly Glu Arg Val His Leu Asn

85            90            95

40

Pro Thr Arg Gly Phe Trp Cys Leu Asn Arg Glu Gln Pro Arg Gly Arg

100            105            110

50

【化 1 - 3】

Arg Cys Ser Asn Tyr His Val Arg Phe Arg Cys Pro Leu Glu Ala Ser

115 120 125

10

Trp Gly Ala Trp Gly Pro Trp Gly Pro Cys Ser Gly Ser Cys Gly Pro

130 135 140

Gly Arg Arg Leu Arg Arg Arg His Cys Pro Ser Pro Ala Gly Asp Ala

145 150 155 160

20

Cys Pro Gly Arg Pro Leu Glu Ala Gln Lys Cys Val Arg Pro Arg Cys

165 170 175

30

Pro Gly Cys Ser Leu Asp Thr Cys Glu Cys Pro Asp His Ile Leu Leu

180 185 190

Gly Ser Val Val Thr Pro Ser Gly Gln Pro Leu Leu Gly Ala Arg Val

195 200 205

40

Ser Leu Arg Asp Gln Pro Gly Thr Val Ala Thr Ser Asp Ala His Gly

210 215 220

50

## 【化 1 - 4】

Thr Phe Arg Val Pro Gly Val Cys Ala Asp Ser Arg Ala Asn Ile Arg

225            230            235            240

Ala Gln Met Asp Gly Phe Ser Ala Gly Glu Ala Gln Ala Gln Ala Asn

10

245            250            255

Gly Ser Ile Ser Val Val Thr Ile Ile Leu Asp Lys Leu Glu Lys Pro

260            265            270

20

Tyr Leu Val Lys His Pro Glu Ser Arg Val Arg Glu Ala Gly Gln Asn

275            280            285

30

Val Thr Phe Cys Cys Lys Ala Ser Gly Thr Pro Met Pro Lys Lys Tyr

290            295            300

Ser Trp Phe His Asn Gly Thr Leu Leu Asp Arg Arg Ala His Gly Tyr

40

305            310            315            320

Gly Ala His Leu Glu Leu Arg Gly Leu Arg Pro Asp Gln Ala Gly Ile

【化 1 - 5】

325 330 335

Tyr His Cys Lys Ala Trp Asn Glu Ala Gly Ala Val Arg Ser Gly Thr

340 345 350

10

Ala Arg Leu Thr Val Leu Ala Pro Gly Gln Pro Ala Cys Asp Pro Arg

355 360 365

20

Pro Arg Glu Tyr Leu Ile Lys Leu Pro Glu Asp Cys Gly Gln Pro Gly

370 375 380

Ser Gly Pro Ala Tyr Leu Asp Val Gly Leu Cys Pro Asp Thr Arg Cys

30

385 390 395 400

Pro Ser Leu Ala Gly Ser Ser Pro Arg Cys Gly Asp Ala Ser Ser Arg

405 410 415

40

Cys Cys Ser Val Arg Arg Leu Glu Arg Arg Glu Ile His Cys Pro Gly

420 425 430

【化 1 - 6】

Tyr Val Leu Pro Val Lys Val Val Ala Glu Cys Gly Cys Gln Lys Cys

435 440 445

10

Leu Pro Pro Arg Gly Leu Val Arg Gly Arg Val Val Ala Ala Asp Ser

450 455 460

Gly Glu Pro Leu Arg Phe Ala Arg Ile Leu Leu Gly Gln Glu Pro Ile

20

465 470 475 480

Gly Phe Thr Ala Tyr Gln Gly Asp Phe Thr Ile Glu Val Pro Pro Ser

485 490 495

30

Thr Gln Arg Leu Val Val Thr Phe Val Asp Pro Ser Gly Glu Phe Met

500 505 510

40

Asp Ala Val Arg Val Leu Pro Phe Asp Pro Arg Gly Ala Gly Val Tyr

515 520 525

【化 1 - 7】

His Glu Val Lys Ala Met Arg Lys Lys Ala Pro Val Ile Leu His Thr

530            535            540

10

Ser Gln Ser Asn Thr Ile Pro Leu Gly Glu Leu Glu Asp Glu Ala Pro

545            550            555            560

Leu Gly Glu Leu Val Leu Pro Ser Gly Ala Phe Arg Arg Ala Asp Gly

565            570            575

20

Lys Pro Tyr Ser Gly Pro Val Glu Ala Arg Val Thr Phe Val Asp Pro

580            585            590

30

Arg Asp Leu Thr Ser Ala Ala Ser Ala Pro Ser Asp Leu Arg Phe Val

595            600            605

Asp Ser Asp Gly Glu Leu Ala Pro Leu Arg Thr Tyr Gly Met Phe Ser

610            615            620

40

【化 1 - 8】

Val Asp Leu Arg Ala Pro Gly Ser Ala Glu Gln Leu Gln Val Gly Pro

625            630            635            640

Val Ala Val Arg Val Ala Ala Ser Gln Ile His Met Pro Gly His Val

645            650            655

10

Glu Ala Leu Lys Leu Trp Ser Leu Asn Pro Glu Thr Gly Leu Trp Glu

660            665            670

20

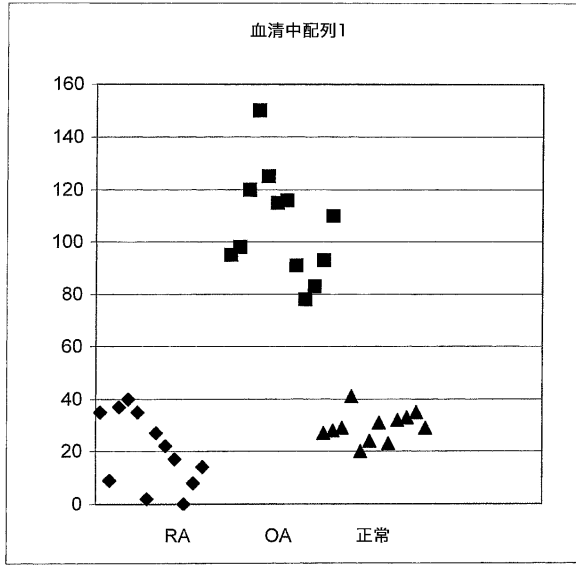
Glu Glu Ser Gly Phe Arg Arg Glu Gly Ser Ser Gly Pro Arg Val Arg

675            680            685

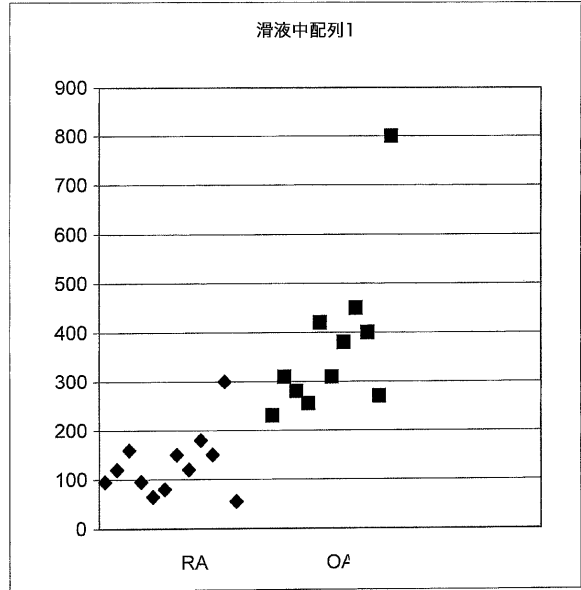
Arg

30

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

[0005364086000001.app](#)

## フロントページの続き

- (74)代理人 100097870  
弁理士 梶原 斎子
- (74)代理人 100140556  
弁理士 新村 守男
- (74)代理人 100114719  
弁理士 金森 久司
- (74)代理人 100143258  
弁理士 長瀬 裕子
- (74)代理人 100124969  
弁理士 井上 洋一
- (74)代理人 100132492  
弁理士 弓削 麻理
- (74)代理人 100163485  
弁理士 渡邊 義敬
- (72)発明者 ロレンツォ、ピラール  
スウェーデン国、ルンド、ケムネルスヴェーゲン 7ジー：114
- (72)発明者 サクスネ、トーレ  
スウェーデン国、ルンド、ストラ セデルガータン 23
- (72)発明者 ハイネゴールド、ディック  
スウェーデン国、ルンド、プロトコルグレンデン 11

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特表2001-526886(JP,A)  
米国特許出願公開第2002/0119452(US,A1)  
国際公開第2007/033215(WO,A1)  
特開平10-082784(JP,A)  
特表2005-528581(JP,A)  
Arthritis & Rheumatism, 2003年, Vol.48, No.5, p1302-1314  
Arthritis & Rheumatism, 2001年, Vol.44, No.4, p838-845

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	用于区分骨关节炎与类风湿性关节炎和无病状态的软骨间质蛋白2C1及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP5364086B2</a>	公开(公告)日	2013-12-11
申请号	JP2010500876	申请日	2008-03-27
申请(专利权)人(译)	Anamaru医疗激活宝来获得		
当前申请(专利权)人(译)	Anamaru医疗激活宝来获得		
[标]发明人	ロレンツォピラール サクスネトーレ ヘイネゴールドディック		
发明人	ロレンツォ、ピラール サクスネ、トーレ ヘイネゴールド、ディック		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/78 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K14/78 C07K16/18 G01N2800/102 G01N2800/105		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C07K14/78 C07K16/18		
代理人(译)	池田幸 新村守男 井上洋一		
优先权	11/728857 2007-03-27 US		
其他公开文献	JP2010522880A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种用于从样本中的类风湿性关节炎和非疾病状况中区分骨关节炎的方法，包括在样本中测量体液中人软骨中间层蛋白2 ( CILP-2 ) 的浓度，更具体地，在样本中测量浓度CILP-2 ( 2C1 ) 的N-末端部分或其片段。

【 图 1 】

