

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5701994号
(P5701994)

(45) 発行日 平成27年4月15日 (2015. 4. 15)

(24) 登録日 平成27年2月27日 (2015. 2. 27)

| | | |
|--------------------------|---------------|-------|
| (51) Int.Cl. | F I | |
| GO 1 N 33/68 (2006. 01) | GO 1 N 33/68 | Z N A |
| GO 1 N 33/53 (2006. 01) | GO 1 N 33/53 | D |
| GO 1 N 27/62 (2006. 01) | GO 1 N 27/62 | V |
| A 6 1 K 45/00 (2006. 01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006. 01) | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 |
| 請求項の数 8 (全 21 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2013-538979 (P2013-538979) | (73) 特許権者 | 398076227 |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年11月14日 (2011. 11. 14) | | ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ イー |
| (65) 公表番号 | 特表2014-503795 (P2014-503795A) | | アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2 |
| (43) 公表日 | 平成26年2月13日 (2014. 2. 13) | | 1 8、ボルチモア、ノース・チャールズ・ ストリート 3 4 0 0 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2011/060640 | (74) 代理人 | 100108855 |
| (87) 国際公開番号 | W02012/065176 | | 弁理士 蔵田 昌俊 |
| (87) 国際公開日 | 平成24年5月18日 (2012. 5. 18) | (74) 代理人 | 100109830 |
| 審査請求日 | 平成25年7月16日 (2013. 7. 16) | | 弁理士 福原 淑弘 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/412, 819 | (74) 代理人 | 100088683 |
| (32) 優先日 | 平成22年11月12日 (2010. 11. 12) | | 弁理士 中村 誠 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100103034 |
| | | | 弁理士 野河 信久 |
| 最終頁に続く | | | |

(54) 【発明の名称】 シトルリン化タンパク質：生理学的および病理学的疾患のマーカーとしての心筋タンパク質の翻訳後修飾

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における虚血性心疾患、心筋症および心不全の診断を補助する方法であって、前記対象から得られた生体試料におけるシトルリン化タンパク質の存在を検出することを含み、シトルリン化タンパク質のレベルがシトルリン化タンパク質の対照量と比べて上昇している場合に虚血性心疾患、心筋症および心不全の可能性を示している方法。

【請求項 2】

前記生体試料が、血液、血漿、血清および組織生検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】

前記組織生検が心筋組織である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記シトルリン化タンパク質が、アルギニン残基からシトルリンへの翻訳後変換を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記シトルリン化タンパク質が、ミオシン重鎖、ミオシン結合タンパク質 C、トロポミオシン 1、トロポミオシン 3、アクチン、タイチン、リポタンパク質リパーゼ、L-乳酸デヒドロゲナーゼ B 鎖、アルファ - 1 - 抗キモトリプシン、カスパーゼ動員ドメイン含有タンパク質 10、ジンクフィンガー Z Z 型および E F - ハンドドメイン含有タンパク質 1 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 6】

前記シトルリン化タンパク質が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 および配列番号 17 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記シトルリン化タンパク質が、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33 および配列番号 34 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記シトルリン化タンパク質の存在が、質量分析、高分解能質量分析、タンデム質量分析、結合アッセイ、免疫アッセイ、抗体結合または免疫組織化学を使用して検出される、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の概要】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は 2010 年 11 月 12 日出願の米国特許仮出願第 61/412,819 号の優先権を主張し、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

[配列表]

本出願は E F S - W e b により A S C I I フォーマットで提出されている配列表を含有し、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2011 年 11 月 9 日作成の前記 A S C I I コピーは、22403203.txt と命名され、サイズは 7,342 バイトである。

【0003】

[連邦政府による資金提供を受けた研究開発に関する記載]

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された N H L B I プロテオミクス契約番号 N I H N 0 1 - H V - 2 8 1 8 0 および R O 1 H L 6 3 0 3 8 の政府支援を受けて行われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

30

【背景】

【0004】

心血管研究および臨床治療の大幅な進歩にもかかわらず、心臓疾患は西洋世界では依然として罹患率および死亡率の主な原因であり、発展途上国では増加している。循環器病 (C V D) は、C V D の 2 つの主因である、虚血性心疾患 (I H D) および心不全 (H F) を含むあらゆる重大な病態に及ぶ広範囲な研究が行われてきた。心不全は、心筋への血液供給が減少して、そのため機能が低下することを特徴とする。心不全患者を薬剤 (たとえば、強心配糖体) を用いて治療すると心筋細胞の収縮力を増加させることによりポンプ機能を増強し、血行動態および運動耐容能を改善することができることも認識されている。これらの所見により、心不全は主に欠陥のある心筋細胞収縮力により引き起こされるという「血行動態仮説」が生まれた。他の要因、すなわち、心構造の変化 (膨張)、細胞死 (アポトーシス)、変化した血管構造および反応性、異常なエネルギー利用ならびに神経ホルモン障害も C V D の進行の一因であることを指摘することは重要である。心収縮機能は、部分的には、筋フィラメントに対する翻訳後修飾 (P T M) により調節されている。この機構が力発生プロセスの直接の原因となっている。動的 P T M も不可逆的 P T M、たとえばリン酸化も筋フィラメントタンパク質に起こり、心疾患の数多くのモデルにおいて観察されてきた。

40

【0005】

50

重要なことに、IHDは急性的に起こり、心筋スタニングもしくは心筋梗塞（心臓発作）を生じ、または慢性的に起こることがあり、心不全の1つの共通原因である。興味深いことに、急性の状況では、間欠性虚血事象は、それに続くより重篤な虚血事象を防ぎ、細胞死および心臓に対する損傷を減らすことがある。これは心筋プレコンディショニングと呼ばれ、腎臓および骨格筋を含む他の多くの器官に起こることは公知である。プレコンディショニングは、部分的に、細胞pHの低下および再灌流とともに起こるカルシウム濃度の増加を減少させる。この状態は、基質タンパク質上のアルギニン残基を標準的でないアミノ酸シトルリンに翻訳後に変換するカルシウム依存性酵素のファミリーであるペプチジルアルギニンデイミナーゼ（PAD）を生じさせることがある。

【0006】

10

アルギニンからシトルリンへの酵素的変換は、生理学的プロセス、たとえば上皮分化、毛包の形成および中枢神経系の発生中のミエリン鞘の分化において起こる。これは、関節リウマチに罹った患者の滑膜においてシトルリン化タンパク質が実証されたことにより人体病理に初めて関連付けられた。最近になって、タンパク質シトルリン化は、非リウマチ様炎症性関節滑膜炎において、また自己免疫神経変性疾患、たとえば多発性硬化症およびアルツハイマー病においても記載されてきた。これらの所見に照らして、我々はシトルリン化は心臓で起こるのかどうか、およびこの修飾が心臓における特定の疾患状態の病理への洞察を与えることになるのかどうかを問うた。さらに、健康または疾患事象の間にPADが心臓に存在するのかどうかを確定する調査はこれまで行われていない。

【0007】

20

心不全および拡張機能障害の発生率は、関節リウマチ（RA）患者では非RA対照と比べると増加し、心筋リモデリングがRA疾患プロセスの一部として起こることが示唆される。RAにおける心不全の表現型は、診察時のより少ない症状、より低い血圧およびより高い駆出率を特徴とする非RA患者の表現型とは異なり、RA患者における心不全への進行の根底にある病態生理学的機序は母集団の機序とは異なる可能性があることが示唆される。最近、既知の循環器病のないRA患者では、血清抗CCP抗体の濃度が高いほど、心筋質量が低く左心室腔容積が小さくなるという関連性が報告されており、シトルリン化タンパク質に対するRA特異的自己免疫が心筋の形態に対する変化を媒介して、この変化が今度は心筋機能に影響を及ぼすことができる可能性が高まっている。シトルリン化、すなわち、塩基性アミノ酸アルギニンから中性アミノ酸シトルリンへの翻訳後修飾の結果、塩基性の電荷が失われ、これにより全体的電荷分布、等電点ならびにイオンおよび水素結合形成に影響を及ぼすことができる。このPTMは、それが、タンパク質フォールディング、分布、安定性、活性および機能を調節しているタンパク質の物理的・化学的特性を変更することができるために、極めて重要である。その反応は、リウマチ滑膜に豊富にあるがRAに限定されていない一連のペプチジルアルギニンデイミナーゼ酵素（PAD）により触媒される。

【0008】

30

北米では、伝染性心筋症がウイルス感染（たとえば、コクサッキーウイルスB3、アデノウイルスまたはパルボウイルスB19）中に起こるまたはそれに続いて起こることがある。実際、免疫心筋症は、特に小児および若年成人におけるHFまたは突然死の重要な原因である。したがって、心筋シトルリン化は他の状態と比べてRAのほうが豊富であり、シトルリン化を示している心筋領域は、組織損傷（すなわち、心筋炎、線維症等）およびPADの証拠と共同在化していると考えられる。

40

【0009】

[概要]

一態様では、本発明は、対象における循環器病を診断する方法であって、対象から得られた生体試料におけるシトルリン化タンパク質の存在を検出することを含む方法を対象とする。別の態様では、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ活性の調節も考慮されている。

【図面の簡単な説明】

【0010】

50

【図1】シトルリン化誘導スキームおよび質量分析法によるその検出を示す図。A) シトルリンのウレイド基は2, 3-ブタンジオンおよびアンチピリンにより修飾されて、修飾シトルリン残基を形成する。質量は239 Da増加している。B) MS/MSスペクトルは誘導体化シトルリンの同定を图示している。

【図2】対照対HF試料(IHD、IDCM)の部位特異的内在性シトルリン化を示す図。ミオシン重鎖は4つのシトルリン化部位を有し、トロポミオシンも4個のシトルリン化部位を有するが、修飾された残基の部位特異性間に違いがある。

【図3】A) 対照およびHF患者(IHD、IDCM)から得られた心臓ホモジネートにおけるシトルリン化タンパク質の検出を示す図。筋フィラメントタンパク質のシトルリン化は、タンパク質負荷における差を補正するために直接ブルー染色に対して表された。* t-検定においてドナー対IHD対IDCMが $p < 0.05$ 。IDCM組織では、ミオシン重鎖シトルリン化対対照およびIHDに有意な増加が見られた。ドナー組織対IDCM試料においてはアクチンシトルリン化のわずかな減少が観察された。B) 対照患者由来の心臓におけるシトルリン化タンパク質の免疫組織化学染色を示す図。(1) 対照の筋原線維においてシトルリン化タンパク質が検出された。(2) 負の対照では、筋原線維は明らかに未染色である。

【図4】多量のタンパク質の確認が対照およびPAD2処理ヒト心臓(左心室)の2D-DIGE解析を用いて実施されたことを示す図。試料はCy2(内部標準)、Cy3(未処理)およびCy5(処理された)で標識された。それぞれのゲルは、一次元ではpI範囲4~7および2Dでは10%線形ポリアクリルアミドゲルにより分離された150 μgの全タンパク質を含有する。A) 緑のシフトがシトルリン化を示している細胞質およびB) 筋フィラメント濃縮画分の代表的な2D-DIGEゲルを示す図。関連画像はTyphoon 9210を使用する異なるレーザーを用いた励起により捕獲された。矢印は、画像解析により決定されLC-MS/MSにより同定された異なる調節を受けたタンパク質スポットを示している。タンパク質は表2に従って番号が付けられている。

【図5】対照マウス(A、B)マウス角化細胞(C)由来の心臓におけるPADアイソフォームの発現レベルのRT-PCR解析を示す図。PCR産物PAD2はすべての種類の試料に見られ、PAD4およびPAD1は心臓線維芽細胞および角化細胞において見られる。PAD3はいずれの試料においても見られなかった。

【詳細な説明】

【0011】

ペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)によるアルギニンからシトルリンへの翻訳後修飾(PMT)はリウマチ滑膜において豊富であり、シトルリン化タンパク質に対する自己免疫はRAに高度に特異的であり(Giles et al. *Arthritis Rheum* 2010年; 62: 940~951頁)、関節損傷の強力な予測因子である(van Gaalen et al. *Arthritis Rheum* 2004年; 50(7): 2113~2121頁)。シトルリン化は、リウマチ滑膜以外の組織において、典型的には、炎症/自己免疫、たとえば多発性硬化症、炎症性腸疾患ならびに多発性筋炎(Makrygiannakis et al. *Ann Rheum Dis* 2006年; 9: 1219~1222頁)虚血性心疾患(IHD)および心不全(HF)を特徴とする状態において観察される。シトルリン化タンパク質の免疫ターゲティングがこれらの障害の表現型特長のどれかを媒介するかどうかは不確かであるが、これらの多様な障害において観察される豊富なシトルリン化により、他の組織、たとえば心筋も翻訳後シトルリン化を示すことができることが示唆される。

【0012】

タンパク質シトルリン化は、 Ca^{2+} 依存性酵素であるペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)のファミリーにより触媒され、この酵素は正電荷を帯びたアルギニン残基を塩基性特性の喪失によりタンパク質の構造および機能を変化させることができる中性シトルリンに脱アミノ化する。この翻訳後修飾(PMT)は、いくつかの生理学的および病理学的プロセスにおけるその役割により関心領域になっている。生理学的プロセスには、上

10

20

30

40

50

皮末端分化、遺伝子発現調節およびアポトーシスが含まれる。多発性硬化症、アルツハイマー病および関節リウマチ（RA）は、タンパク質シトルリン化関与が実証されているヒト疾患の例である。タンパク質シトルリン化は、虚血/再灌流損傷もしくは心不全（HF）単独の進行および発症においてまたはRAおよび他の疾患に関してある役割を果たしている我々は提唱する。さらに、リウマチ滑膜においてシトルリン化を受け（すなわち、ビメンチン、エノラーゼ、フィブロンネクチン）、RAにおける抗CCP抗体の標的であるタンパク質標的の一部は心筋にも存在している（Giles et al., *Arthritis Rheum* 2010年、62:940~951頁）。心筋におけるタンパク質はシトルリン化の基質としての役割を果たしていることを我々は明らかにしている。さらに、機能不全の特定の機序に限定されることなく、筋フィラメントにおける基本的収縮要素がシトルリン化されると心筋機能不全の一因となり得る可能性がある。タンパク質シトルリン化は正常心臓（健康な）において起こり、タンパク質シトルリン化状態は心疾患とともに変化することを我々は明らかにしている。我々は、心臓からならびに心筋細胞から単離された組織においてシトルリン化タンパク質およびその修飾されたアミノ酸残基を同定した。修飾されたタンパク質の数および修飾されたアミノ酸は異なる心疾患表現型を反映することができる。一態様では、本発明は、血漿または血清ならびに組織（たとえば、生検）におけるシトルリン化タンパク質および無傷のまたは分解したタンパク質のシトルリン化の部位の検出に焦点を合わせている。別の態様では、シトルリン化タンパク質は心筋疾患に対する診断マーカーとして使用することが可能である。別の態様では、PAD活性は調節することができる。

10

20

【0013】

心筋収縮力の調節および増強は多くの疾患環境において求められている。重要な心筋特異的筋フィラメントタンパク質のシトルリン化が起こり、したがって、心臓の収縮能を調節するのに中心的役割を有する可能性がある。シトルリン化を調節（増加または減少）すれば、急性（たとえば、虚血再灌流障害）および慢性（たとえば、心不全）疾患表現型における心臓機能の制御を可能にすることができるであろう。組織または体液（たとえば、血液、血漿および血清）におけるシトルリン化タンパク質の検出は、心筋損傷および心不全を含む心疾患に罹っている患者における診断、予後またはリスク層別化のバイオマーカー（複数可）になり得る。シトルリン化心臓タンパク質は、特に心筋損傷に続いて分泌されるまたは放出される場合、循環している自己抗体の免疫標的として作用してもよい。

30

【0014】

RAにおける心筋症の役割。RA患者における心血管罹患率および死亡率の証拠の増加が最近認識された。研究によれば、心筋梗塞（MI）、心不全（HF）および脳卒中のリスクはRAに罹った患者のほうが高く、これらの患者の死亡の最大40%を引き起こし得ることが明らかにされている（Wolfe et al., *Arthritis Rheum* 2008年、9:2612~2621頁；Levy et al., *Clin Exp Rheumatol* 2008年、4:673~679頁；Nadareis hvili et al., *Arthritis Rheum* 2008年、8:1090~1096頁；Lopex-Longo et al., *Arthritis Rheum* 2009年 4:419~424頁；Sihvonon et al., *Scand J Rheumatol* 2004年 33:221~227頁）。疾患の根底にある炎症プロセスがRAの発症に先立って起こる抗CCP抗体の産生/誘導の一因となっており、虚血性心疾患の発症と独立して関連している可能性がある。関節リウマチでは推測されている（Turesson et al., *Ann Rheum Dis* 2007年、66:70~75頁）。抗CCP抗体はRAに対する特異的マーカーである（Yamada et al., *Future Rheumatology* 2006年、2:249~258頁）。シトルリン化は、自己免疫神経変性疾患、たとえば、多発性硬化症およびアルツハイマー病において（Nicholas et al., *J Comp Neurol* 2003年、2:51~66頁；Shida-Yamamoto et al., *Journal of Investigative Dermatology* 20

40

50

02年、118:282~287頁)ならびに様々な一般的な生物学的プロセス、たとえば、上皮末端分化、遺伝子発現調節およびアポトーシスでも(Shibata et al., Journal of Dermatological Science 2009年、53:34~39頁; Mastronardi et al., J Neurosci 2006年、44:11387~11396頁; Lundberg et al., Arthritis Rheum 2008年、58:3009~3019頁; Raptopoulou et al., Crit Rev Clin Lab Sci 2007年、44:339~363頁; Gabriel et al., Arthritis Rheum 1999年、42:415~420頁)起こる。我々は、ヒト心臓の画分を調べ、健康対HF個人におけるシトルリン化タンパク質を確定した。さらに、修飾(複数可)を有するタンパク質が疾患により変化するのかどうか、または修飾がタンパク質機能に影響を及ぼすことができるのかどうかを判定した。

10

【0015】

シトルリン化(脱アミノ化としても知られる)は、正電荷を帯びたアミノ酸残基アルギニンから中性電荷シトルリンへの変換を特徴とするPTM(翻訳後修飾)である(図1)。シトルリンの導入は、タンパク質の全電荷分布、等電点ならびにイオンおよび水素結合形成能に影響を及ぼす強塩基性特性($pI = 10.76$)の喪失によりタンパク質の構造および機能を劇的に変化させることができる。理論に限定されたくはないが、そのような変化はタンパク質構造を変更することができ、いくらかほぐれたより開いた立体配置をもたらす(Tarcsa et al., J Biol Chem 1996年、48:30709~30716頁)。したがって、シトルリン化は、分子と他のタンパク質の相互作用にも影響を与えることができる。たとえば、ビメンチンフィラメントのシトルリン化はほぼ完全な脱重合を誘導して、細胞骨格ネットワークを破壊することができる(Inagaki et al., J Biol Chem 1989年、264:18119~18127頁; Backs et al., Circulation Research 2006年、98:15~24頁)。ヒストンでは、シトルリン化はヌクレオソーム-ヌクレオソーム相互作用に抑制効果があり、したがってこの効果は高次クロマチン構造に影響を及ぼすことが最近わかった(Spencer et al., Gene 1999年、240:1~12頁)。最近の研究により、急性および慢性ストレス刺激に対する応答での心臓増大および遺伝子発現の制御におけるクロマチンリモデリングの重要性が実証された。さらに、ヒストンでのアルギニンメチル化もクロマチン構造に影響を及ぼす。本研究にとって重要であるが、シトルリン化において利用される酵素がアルギニンメチル化を間接的にアンタゴナイズすることができることが明らかにされた(Spencer et al., Gene 1999年、240:1~12頁)。ヒストンのシトルリン化と脱アセチル化間のこの機能的関連は、心機能の変更をもたらす急性および慢性ストレス刺激に対する応答でのリモデリングまたは遺伝子発現にある隠れた意味合いを有する可能性がある。

20

30

【0016】

本明細書で発明者らは、健康な患者における(表1A)および心不全(罹患した)患者における(表1B)シトルリン化タンパク質を開示する。シトルリン化は、筋フィラメントタンパク質;トロポミオシン、ミオシン(重および軽鎖)およびミオシン結合タンパク質Cを含む特定のタンパク質において起こり、この修飾がこれらの筋フィラメントタンパク質が優勢でもある骨格筋においても見ることができることが示唆される。この情報を用いて、循環器病に対する感受性およびシトルリン化タンパク質に対する自己免疫に対する感受性を診断することが今や可能である。したがって、循環器病を診断する方法が開示される。循環器病におけるシトルリン化タンパク質に対する自己免疫に対する感受性を診断する方法が開示される。どちらの方法にも、組織または血液、血漿もしくは血清を含む体液におけるシトルリン化タンパク質の検出が含まれる。

40

【表1】

表1A. MS/MS(タンデム質量分析)を使用する標的解析により
同定された健康な個人におけるシトルリン化タンパク質の一覧

| タンパク質ID | 配列中の修飾された残基 | タンパク質機能 | |
|--|--|---|----|
| ミオシン重鎖 | Arg ₁₄₇₉ SerLeuSerThrGluLeuPheLys (配列番号:1) Arg ₁₁₇₆ AspLeuGluGluAlaThrLeuGlnHisGluAla ThrAlaAlaAlaLeuArgLys (配列番号:2) HisArgLeuGlnAsnGluIleGluAspLeuMetValAsp ValGluArg ₁₄₃₄ Ser (配列番号:3) LysLysLeuAlaGlnArg ₁₄₀₀ LeuGlnGluAlaGluGlu uHisValGlu (配列番号:4) | 筋収縮 | 10 |
| ミオシン結合 タンパク質C、心臓性 トロポミオシンα1 | Arg ₆₉₆ ProAlaProAspAlaProGluAspThrGlyAsp SerAspGluTrpValPheAspLys (配列番号:5) GluAspArg ₂₂₀ TyrGluGluGluIleLys (配列番号:6) GluThrArg ₂₃₈ AlaGluPheAlaGluArgSerValThr LysLeuGluLys (配列番号:7) | 筋収縮および太いフィラメントを結束させる 筋収縮のカルシウム依存性調節において 中心的役割を果たす | |
| トロポミオシンα3 | AlaGluGluAlaAspArg ₁₂₄ LysTyrGluGluValAlaA rgLys (配列番号:8) | 脊椎動物横紋筋収縮の調節におけるトロポ ニン複合体との関連において役割を果たす | |
| アクチン | AlaGlyPheAlaGlyAspAspAlaProArgAlaValPh eProSerIleValGlyArgProArg ₃₉ HisGln (配列番号:9) | 伸縮および収縮性活性 | 20 |
| タイチン | ValAsnSerArg ₁₅₁₇₂ ProlleLysAspLeuLys (配列番号:10) TyrArg ₃₁₈₁₁ IleGlnGluPheLysGlyGlyTyrHis (配列番号:11) AspIleLeulleProProGluGlyGluLeuAspAlaAsp LeuArg ₂₀₅₃₅ Lys (配列番号:12) | 脊椎動物横紋筋の組立ておよび作動に おける重要な成分:タイチンは筋節の 左右中間部の力の微妙な均衡に寄与する | |
| リポタンパク質リパーゼ | ValIleAlaGluArg ₂₅₄ GlyLeuGlyAspValAspGlnL euValLys (配列番号:13) | 循環しているカイロミクロンおよび超低密度リポタン パク質(VLDL)のトリグリセリドの加水分解。細胞表面 での硫酸ヘパリンプロテオグリカンとの結合はその 機能に不可欠である | |
| L-乳酸 デヒドロゲナーゼB鎖 | IleValValValThrAlaGlyValArg ₁₀₀ GlnGlnGluGl yGluSerArgLeuAsnLeuVal (配列番号:14) | 触媒活性 (S)-乳酸+NAD ⁺ =ピルビン酸+NADH | 30 |
| アルファ-1- 抗キモトリプシン | Arg ₁₈₄ LeuTyrGlySerGluAlaPheAlaThrAspPhe GlnAspSerAlaAlaAlaLysLysLeulle (配列番号:15) | どちらもアンジオテンシン-1を活性アンジオテンシン- 2に変換することができる好中球カテプシンGおよび マスト細胞キマーゼを阻害することができる | |
| カスパーゼ動員 ドメイン含有 タンパク質10 | SerArg ₂₂₈ AspLeuGlnLeuAlaValAspGlnLeuLy sLeuLys (配列番号:16) | BCL10およびIKKを介してNF-κBを 活性化する | |
| ジンクフィンガーZZ型 およびEF-ハンドドメイン 含有タンパク質1 | LysLeuAspProLeuGluGlyLeuAspGluProThrA rg ₂₄₆₄ (配列番号:17) | タンパク質結合 | |
| カスキ(Caskin)1 | Arg ₁₃₀₅ GlnProProAlaAlaLeuAlaLysProProGly ThrProProSerLeuGlyAlaSerProAlaLys (配列番号:18) | 足場タンパク質CASKを下流細胞内 エフェクターに連結することができる | 40 |

【表2】

表1B. MS/MSを使用する標的解析によりHF患者において発見されたシトルリン化タンパク質の一覧

| タンパク質ID | 配列中の修飾された残基 | タンパク質機能 | |
|--------------------------------------|--|---|----|
| ミオシン重鎖 | Arg ¹⁴⁷⁹ SerLeuSerThrGluLeuPheLys (配列番号:19) LeulleSerGlnLeuThrArg ¹⁹⁰³ GlyLysLeuThrTyrThrGlnGln LeuGluAspLeuLys (配列番号:20) GlnArg ¹³⁹⁷ LeuGlnAspSerGluGluGlnValGluAlaValAsnAlaLys (配列番号:21) | 筋収縮 | |
| ミオシン結合タンパク質C、心臓性トロポミオシン α 1 | Arg ⁶³⁶ ProAlaProAspAlaProGluAspThrGlyAspSerAspGluTrpValPheAspLys (配列番号:22) GluThrArg ²³⁸ AlaGluPheAlaGluArgSerValThrLysLeuGluLys (配列番号:23) | 筋収縮および太いフィラメントを結束させる 筋収縮のカルシウム依存性調節において中心的役割を果たす | 10 |
| トロポミオシン3 | LeuGluGluAlaGluLysAlaAlaAspGluSerGluArgGlyMetLysValleGluAsnArg ¹³⁴ AlaLeuLys (配列番号:24) | アクチンフィラメントに結合し、脊椎動物横紋筋収縮を調節する | |
| アクチン | AlaGlyPheAlaGlyAspAspAlaProArgAlaValPheProSerlleValGlyArgProArg ³⁹ HisGln (配列番号:25) | 伸縮および収縮性活性 | |
| リポタンパク質リパーゼ | ValleAlaGluArg ²⁵⁴ GlyLeuGlyAspValAspGlnLeuValLys (配列番号:26) | 循環しているカイロミクロンおよび超低密度リポタンパク質(VLDL)のトリグリセリドの加水分解。細胞表面での硫酸ヘパリンプロテオグリカンとの結合はその機能に不可欠である | |
| スルフヒドリルオキシダーゼ2 | LeuPheProGlyArg ³⁶⁷ ProProValLys (配列番号:27) | スルフヒドリル基のジスルフィドへの酸化を触媒し、酸素の過酸化水素への還元を伴う | 20 |
| 推定ジンクフィンガータンパク質818 | AsnAspGluArg ²²⁴ AsnTyrArgGluIleProAlalleLyslleLys (配列番号:28) | 転写調節に関与することができる | |
| ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼドメイン含有タンパク質10 | CysAspValPheMetArgCysArgLeuValAspAlaAspGlyProLeuAlaArg ⁶⁵⁶ LeuLysLys (配列番号:29) | TNF- α およびヘパリン結合上皮増殖様因子、エフリン-A2を含む他の細胞表面タンパク質のタンパク質分解性放出の原因となる | |
| タイチン | TyrArg ³¹⁸¹ IleGlnGluPheLysGlyGlyTyrHis (配列番号:30) LeuSerGlyValLeuThrValLysAlaGlyAspThrIleArg ¹⁹⁰⁵⁵ (配列番号:31) | 脊椎動物横紋筋の組立ておよび作動における重要な成分;タイチンは筋節の左右中間部の力の微妙な均衡に寄与する | |
| ジンクフィンガーZZ型およびEF-ハンドドメイン含有タンパク質1セルピン | LysLeuAspProLeuGluGlyLeuAspGluProThrArg ²⁴⁶⁴ (配列番号:32) PheTyrGlnThrSerValGluSerThrAspPheAlaAsnAlaProGluGluSerArg ¹⁴⁴ LysLys (配列番号:33) | タンパク質結合 | |
| tRNA-ジヒドロウリジンシターゼ | GlyGlnGluLysThrCysArg ⁵⁵ GluThrGluValGlyAspProAlaGlyAsnGluLeuAlaGluProGluAlaLys (配列番号:34) | プロテアーゼ阻害剤として作用して腫瘍細胞に対する宿主免疫応答を調節する 大半のtRNAのDループに見出される修飾された塩基であるジヒドロウリジンの合成を触媒する | 30 |

【0017】

アルギニンアミノ酸残基からシトルリンへの変換はタンパク質の構造にいくつかの意味合いを有しており、たとえば、シトルリンのウレイド基は、その尿素様特性によりタンパク質構造に対して不安定化効果を有することができる; 立体構造変化を誘発することもでき、等電点(pI)値および電気泳動移動度を変更することができる。シトルリンのこの不安定化効果は、これらのタンパク質の組織化された二次構造の喪失をもたらす、フィラグリン、トリコヒアリンおよびミエリン塩基性タンパク質を含むいくつかのタンパク質に関して記載されている。シトルリン化に伴う正電荷の喪失は、タンパク質間の相互作用に大きな影響を与え、シグナル伝達能を調節し、タンパク質分解に対する感受性を妨げると予測することも可能である。したがって、このPTMは、いくつかの生理学的および病理学的プロセスにおけるその役割により関心領域になっている。生理学的プロセスには、上皮末端分化、遺伝子発現調節およびアポトーシスが含まれる。多発性硬化症、アルツハイマー病および関節リウマチ(RA)は、タンパク質シトルリン化関与が実証されているヒト疾患の例である。タンパク質シトルリン化は、虚血/再灌流損傷、心筋プレコンディショニングまたは心不全の進行および発症にある役割を果たすことができる。

【0018】

5個のPADアイソフォーム(PAD1からPAD5およびPAD6)が存在し、そ

10

20

30

40

50

れぞれが別々の遺伝子によりコードされている。アイソフォームは高度なアミノ酸配列相同性を共有しているが、異なる組織特異的発現を有しているように思われる。RT-PCRまたはノーザンブロット解析により、PAD2およびPAD4は単離された心筋細胞（成人）に、さらにPAD1は心臓から得られる単離された心筋線維芽細胞（成人）に見出されることが明らかにされた。PAD1、PAD2およびPAD4は骨格筋にも存在するが心臓よりも高いレベルで存在する。この所見により、これらのアイソフォームは、心臓におけるアルギニンの脱アミノ化の原因であることが示唆される。本明細書で開示されるように、心筋細胞および心筋線維芽細胞に特異的であるPADアイソフォームの調節は、PADに対してまたは特定のアイソフォームに対して開発された干渉RNA（たとえば、siRNA）を使用すれば可能である。遺伝子療法アプローチを使用して、標的組織においてPADアイソフォームを増加させることが可能である。これは、改変ウイルスまたはDNAの*in vivo*取り込みのための他の確立した方法を使用して実現することが可能である。PADアイソフォームの特定の阻害剤を使用して内在性活性を低下させることが可能である。さらに、PADの触媒ドメイン内のArgおよびCysからAlaまたは他のアミノ酸残基への突然変異を使用して酵素機能を低下させることが可能である。

10

【0019】

PADアイソフォーム活性を調節する方法において有用である当技術分野で公知のPAD阻害剤がいくつか存在する。これらには、F-アミジン[N-ベンゾイル-N5-(2-フルオロ-1-イミノエチル)-1-オルニチンアミド]、2-クロロアセトアミジンおよびCl-アミジン[N-ベンゾイル-N5-(2-クロロ-1-イミノエチル)-1-オルニチンアミド]が含まれる。

20

【0020】

[定義]

以下の用語は、他の方法で指示されなければ、以下の本出願全体を通じて定義される通りに使用される。

【0021】

「マーカー」または「バイオマーカー」は本明細書では互換的に使用され、本発明の文脈では、特定のシトルリン化アミノ酸残基を有するタンパク質もしくはペプチドまたは対照値と比べた場合、特定の疾患もしくは障害を有する患者から採取された試料に差次的に存在する酵素それ自体、PAD1、PAD2もしくはPAD4（特定の特異的同一性または見掛けの分子量の）のことであり、対照値は、たとえば、対照対象（たとえば、陰性診断の人、正常または健康な対象）から採取された比較可能な試料における平均値または中間値からなる。バイオマーカーは、抗体または質量分析により検出することができる特定のペプチドまたはタンパク質（表1Aまたは表1B）として決定してもよい。一部の出願では、たとえば、質量分析または他のプロファイルまたは複数の抗体を使用して複数のバイオマーカーを決めてもよく、個々のバイオマーカーおよび/または部分的もしくは完全なプロファイル間の違いを診断のために使用してもよい。これは、酵素またはシトルリン化したタンパク質の、単独でのまたは組み合わせたの検出を含むことが可能である。

30

【0022】

語句「差次的に存在する」とは、対照対象と比べた場合に、特定の疾患または障害を有する患者から採取された試料中に存在するマーカーの量および/または発生頻度の違いのことを指す。たとえば、マーカーは、対照値（たとえば、対照対象の試料から決定される）と比べた疾患または障害を有する患者の試料中に上昇したレベルでまたは減少したレベルで存在することがある。代わりに、マーカーは、対照対象の試料と比べた患者の試料においてより高い頻度でまたはより低い頻度で検出されることがある。マーカーは、量、頻度またはその両方ならびに2つ以上の特定の修飾されたアミノ酸残基および/または酵素それ自体の間の違いの比に関して差次的に存在することがある。

40

【0023】

マーカー、化合物、組成物または物質は、試料中のマーカー、化合物、組成物もしくは物質の量が別の試料中のマーカー、化合物、組成物もしくは物質の量と、または対照値と

50

統計的に有意に異なっているならば、試料中に差次的に存在している。たとえば、化合物は、それがもう一方の試料（たとえば、対照）中に存在するよりも少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約150%、少なくとも約180%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約500%、少なくとも約700%、少なくとも約900%もしくは少なくとも約1000%多いまたは少なく存在するならば、あるいは化合物が1つの試料では検出可能であるがもう一方の試料では検出可能ではないならば、差次的に存在している。

【0024】

代わりにまたはさらに、マーカー、化合物、組成物または物質は、特定の疾患または障害に罹っている患者の試料においてマーカー等を検出する頻度が健康な個人から得られた対照試料または対照値よりも統計的に有意に高いまたは低いならば、試料間で差次的に存在する。たとえば、バイオマーカーは、それがもう一方のセットの試料よりも一セットの試料中で観察される少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約150%、少なくとも約180%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約500%、少なくとも約700%、少なくとも約900%もしくは少なくとも約1000%高い頻度でまたは低い頻度で検出されるならば、2つのセットの試料間で差次的に存在している。これらは例示的な値であるが、当業者であれば、マーカーが差次的に存在しているかどうかを判定するために統計的に有意な違いを表すカットオフポイント等を決定することができると思われ。

【0025】

「診断の」は、病的状態の存在または性質を確認することを意味し、特定の疾患または障害を発症する危険のある患者を確認することを含む。診断法はその感度および特異度が異なる。診断アッセイの「感度」は、罹患した個人で陽性反応を示す百分率である（「真の陽性」の百分率）。アッセイでは検出されない罹患した個人は「偽陰性」である。罹患していない対象およびアッセイにおいて陰性反応を示す対象は「真の陰性」と呼ばれる。診断アッセイの「特異度」は、1 - 偽陽性率であり、「偽陽性」率は、疾患がなく陽性反応を示す者の割合と定義される。特定の診断法は状態の確定診断を提供しなくてもよいが、その方法が、診断に役立つ陽性の徴候を提供すれば、それで十分である。

【0026】

用語「検出」、「検出する」等は、バイオマーカーを検出するまたは疾患もしくは障害を検出するという文脈において（たとえば、陽性のアッセイ結果が得られる場合）使用してもよい。後者の文脈では、「検出する」と「診断する」は同義と見なされる。

【0027】

「の危険がある」は、正常対象と比べて、または対照群、たとえば、患者集団と比べて、危険が増加していることを意味することが意図されている。したがって、特定のマーカーを担持している対象は、特定の疾患または障害の危険が増加しており、さらに検査が必要であると確認されてもよい。「増加した危険」または「高い危険」は、たとえば、対象が障害に罹っている確率の任意の統計的に有意な増加を意味する。その危険は、比較されている対照群よりも、好ましくは少なくとも10%、さらに好ましくは少なくとも20%、さらに好ましくは少なくとも50%増加している。

【0028】

マーカーの「試験量」とは、試験されている試料中に存在するマーカーの量のことを指す。試験量は、絶対量（たとえば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対量（たとえば、シグナルの相対強度）のいずれであっても可能である。

【0029】

マーカーの「診断量」とは、特定の疾患または障害の診断にふさわしい対象の試料中のマーカーの量のことを指す。診断量は、絶対量（たとえば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対量（たとえば、シグナルの相対強度）のいずれであっても可能である。

【0030】

マーカーの「対照量」とは、マーカーの試験量に対して比較されることになる任意の量

10

20

30

40

50

でもまたは一定範囲の量であっても可能である。たとえば、マーカーの対照量は、診断しようとする疾患または障害に罹っていないヒトにおけるマーカーの量であることができる。対照量は、絶対量（たとえば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対量（たとえば、シグナルの相対強度）のいずれであっても可能である。

【0031】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基、特に、天然に存在するアミノ酸のポリマーを指すのに本明細書では互換的に使用される。この用語は、1個以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の類似物または模倣物であるアミノ酸ポリマーならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用する。ポリペプチドは、たとえば、炭水化物残基を付加して糖タンパク質を形成する、リン酸化してリン酸化タンパク質を形成する、および多数の化学修飾（たとえば、酸化、脱アミド、アミド化、メチル化、ホルミル化、ヒドロキシメチル化、グアニジン化）することにより修飾する、ならびに分解する、還元するまたは架橋することが可能である。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、タンパク質のあらゆる無修飾および修飾形態を含む。ペプチドはシトルリン化残基を有すると考えられるまたはPAD酵素の一部である。

【0032】

「検出可能部分」または「標識」とは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的または化学的手段により検出可能な組成物のことを指す。たとえば、有用な標識には、 ^{32}P 、 ^{35}S 、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素（たとえば、ELISAにおいて一般的に使用されているような）、ビオチン-ストレプトアビジン、ジオキシゲニン、ハプテンおよび抗血清もしくはモノクローナル抗体が利用可能であるタンパク質または標的に相補的である配列を有する核酸分子が含まれる。検出可能部分は、試料中の結合した検出可能部分の量を定量化するのに使用することができる測定可能なシグナル、たとえば放射性、色素生産性または蛍光シグナルを発生することが多い。シグナルの定量化は、たとえば、シンチレーション測定、デントメトリー、フローサイトメトリーまたは潜在的シトルリン化残基またはPAD酵素の一部を有する無傷のタンパク質もしくはペプチドの質量分析による（1個以上のペプチドを評価することが可能である）直接解析により達成される。タンパク質またはペプチドの一部としてのシトルリン化ArgはMSによりまたは化学的誘導体化を介して直接検出することが可能である。

【0033】

「抗体」とは、免疫グロブリン遺伝子または複数の免疫グロブリン遺伝子、またはそれらの断片により実質的にコードされていて、エピトープ（たとえば、抗原）に特異的に結合し認識するポリペプチドリガンドのことを指す。認知された免疫グロブリン遺伝子には、カッパおよびラムダ軽鎖定常領域遺伝子、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー重鎖定常領域遺伝子ならびに夥しい免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。抗体は、たとえば、無傷の免疫グロブリンとしてまたは様々なペプチダーゼでの消化により産生されるいくつかの特徴がはっきりした断片として存在する。これには、たとえば、Fab'およびF(ab)'₂断片が含まれる。本明細書で使用される用語「抗体」は、全抗体の修飾により産生される抗体断片または組換えDNA方法論を使用して新規に合成される抗体断片のいずれも含まれる。その用語にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体または一本鎖抗体も含まれる。抗体の「Fc」部分とは、免疫グロブリン重鎖のうち1個以上の重鎖定常領域ドメイン、CH₁、CH₂およびCH₃を含むが重鎖可変領域は含まない部分のことを指す。

【0034】

「結合アッセイ」は、作用物質、たとえば抗体に結合することによりバイオマーカーが検出される生化学アッセイを意味し、これを通じて検出プロセスが実施される。検出プロセスは、放射性または蛍光標識等を含んでいてもよい。そのアッセイは、バイオマーカーの固定化を含んでいてもよいし、溶液中で行われてもよい。さらに、シトルリン化残基との化学的結合は直接行うことが可能である。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

「免疫アッセイ」は、抗原（たとえば、マーカー）に特異的に結合する抗体を使用するアッセイである。免疫アッセイは特定の抗体の特異的結合特性を使用して抗原を単離する、標的にするおよび/または定量化することを特徴とする。

【 0 0 3 6 】

抗体に「特異的に（または、選択的に）結合する」またはタンパク質もしくはペプチドに言及する場合は「と特異的に（または、選択的に）免疫反応性である」という語句は、タンパク質および他の生物製剤の異種集団におけるタンパク質の存在を判定する結合反応のことを指す。したがって、所定の免疫アッセイ条件下では、特定の抗体は特定のタンパク質にバックグラウンドの少なくとも2倍結合し、試料中に存在する他のタンパク質に大量には実質的に結合しない。そのような条件下での抗体との特異的結合には、特定のタンパク質に対するその特異性で選択される抗体が必要となり得る。種々の免疫アッセイフォーマットを使用して、特定のタンパク質との特異的免疫反応性のある抗体を選択してもよい。たとえば、固相ELISA免疫アッセイはタンパク質との特異的免疫反応性のある抗体を選択するのに日常的に使用されている（たとえば、特定の免疫反応性を決定するのに使用することができる免疫アッセイフォーマットおよび条件の説明については、Harlow & Lane、Antibodies、A Laboratory Manual（1988）参照）。

10

【 0 0 3 7 】

「シトルリン化を検出するための方法」とは、シトルリン化されたペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を検出するために使用される質量分析（MS）ベースの方法のことを指す。その方法は、脱イミノ化がArg上で起こる場合は1Daの中性喪失；未修飾シトルリンからのイソシアン酸の中性喪失（このイオンをタンパク質シトルリン化を検出するための診断マーカーとして使用する）；238Daまたは239Daの化学修飾がCit残基上で起こる場合は誘導体化（ペプチドおよびタンパク質レベルでモニターすることが可能である）；ビーズ/カラム/マトリックス上に固定化され、低pHでシトルリン残基のウレイド基と独占的に反応するグリオキサール誘導体の特異的反応に基づくシトルリン化ペプチド（またはタンパク質）の濃縮を含むがこれらに限定されない。同様に、標的、たとえば、複数のまたは選択的反応モニタリングを使用するMSは修飾されたペプチドを直接定量化するのに使用することが可能である。本明細書で使用されるように、既知の濃度の標識された（たとえば、N15または安定同位体が付加された化学物質）ペプチドは試料に添加され、内在性（非標識）の対応するペプチドと直接比較される。

20

30

【 0 0 3 8 】

用語「対象」、「患者」または「個人」は一般的にはヒトのことを指すが、本発明の方法はヒトに限定されることはなく、他の動物（たとえば、トリ、爬虫類、両生類、哺乳動物）において、アルブミンが種間で相同であるために、特に哺乳動物において有用なはずである。

【 0 0 3 9 】

「試料」は本明細書ではそのもっとも広い意味で使用される。試料は、血液、血清、血漿、涙液、眼房水および硝子体液、髄液を含む体液；細胞もしくは組織調製物の可溶性画分または細胞が増殖された培養液；あるいは細胞または組織から単離されたまたは抽出された膜；溶液中のまたは基質に結合しているポリペプチドまたはペプチド；細胞；組織；組織プリント；指紋、皮膚または毛髪；その断片および誘導体を含んでいてもよい。対象試料は通常、血液、血漿および血清を含む血液製剤の誘導体を含む。

40

【 0 0 4 0 】

用語「特異的PADアイソフォームの調節」は、遺伝子治療、siRNA、PADの公知の阻害剤または部位特異的突然変異誘発を使用して内在性PADアイソフォームの活性を増加するまたは減少することを含むが、これらに限定されない。

【 0 0 4 1 】

[実施例]

50

組織試料：ヒト左心室（LV）経壁組織試料は、末期ISHD、IDCMおよび非不全ドナー心臓を有する患者から得られた。これらの非特定化組織保存試料由来の組織は心停止液中に収集され、液体窒素中で保存された。試料は、Dr. Cris Dos Remedios、University of Sydney、Australiaにより我々に提供された。本研究ではサブセットが解析される（表2）。

【表3】

| コード番号 | 種類 | ID番号 | 性別 | 年齢 | LVEF (%) |
|-------|------|-------|----|----|----------|
| 1 | ISHD | 3.062 | M | 31 | 23 |
| 2 | ISHD | 3.007 | M | 45 | - |
| 3 | ISHD | 2.063 | M | 46 | 25 |
| 4 | ISHD | 3.123 | M | 47 | 20 |
| 5 | ISHD | 3.078 | M | 50 | - |
| 6 | ISHD | 3.106 | M | 52 | - |
| 7 | ISHD | 3.105 | M | 54 | - |
| 8 | ISHD | 3.143 | M | 54 | - |
| 9 | ISHD | 3.075 | F | 43 | - |
| 10 | ISHD | 3.103 | F | 49 | - |
| 11 | IDCM | 2.092 | M | 43 | - |
| 12 | IDCM | 3.104 | M | 46 | - |
| 13 | IDCM | 3.138 | M | 56 | 15 |
| 14 | IDCM | 2.095 | M | 57 | 10 |
| 15 | IDCM | 4.098 | M | 58 | 20 |
| 16 | IDCM | 4.058 | M | 60 | 15 |
| 17 | IDCM | 3.096 | F | 23 | 15 |
| 18 | IDCM | 3.159 | F | 31 | 20 |
| 19 | IDCM | 2.111 | F | 53 | 20 |
| 20 | IDCM | 2.115 | F | 54 | 22 |
| 21 | ドナー | 4.015 | M | 19 | - |
| 22 | ドナー | 2.152 | M | 23 | - |
| 23 | ドナー | 4.013 | M | 23 | - |
| 24 | ドナー | 3.135 | M | 26 | - |
| 25 | ドナー | 3.145 | M | 39 | - |
| 26 | ドナー | 2.149 | M | 44 | - |
| 27 | ドナー | 3.141 | M | 52 | - |
| 28 | ドナー | 3.084 | F | 27 | - |
| 29 | ドナー | 3.073 | F | 41 | - |
| 30 | ドナー | 3.056 | F | 45 | - |

【0042】

心臓組織の細分画：その方法により、異なるpHでの可溶性に基づいて3つの分画：（1）細胞質濃縮された抽出物（中性pH）、（2）筋フィラメント濃縮された抽出物（酸性pH）および（3）膜タンパク質濃縮されたペレットが生じる。このような方法での心臓組織の分画は徹底的なプロテオーム解析の基礎を提供する（Kane et al.,

10

20

30

40

50

Cardiovascular Proteomics 2007年、357:87~90頁)。

【0043】

質量分析によるタンパク質シトルリン化の標的解析: MSは、タンパク質およびペプチドに対するPTMの解析のための最適の方法になっている。しかし、PTMは典型的には、異種の複雑なタンパク質混合物中に比較的少量で存在する。具体的には、シトルリン化の場合、その同定は、アルギニンからシトルリンへの変換に起因する質量シフトがわずかである(+1 Da)という事実のために複雑であり、低分解能MS計測手段を使用してシトルリン化を同定するのは困難になっている。この難問を克服するために、我々はLTQ Orbitrap高分解能MSを使用した(Stensland et al., Rapid Commun Mass Spectrom 2009年、23:2754~2762頁)。その上、この誘導体化戦略はシトルリン残基に ± 239 Daの特定の質量タグ(図1A)を付加するので、修飾部位を確信的に同定することができる。我々の最近の調査によれば、この戦略を使用することにより、異種混合物、たとえば、ウシ血清アルブミン(BSA)のトリプシン消化物からシトルリン化ペプチドを同定することができることが明らかになっている(図1B)。

【0044】

二次元ゲル電気泳動: 二次元ゲル電気泳動(2DE)は、一次元における固定化pH勾配18cmストライプ(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)、pH範囲4~7で実施された。試料は、4%w/v CHAPS、7M尿素、2Mチオ尿素、10mM Tris-HCl、pH8.3および1mM EDTAを含有する2-DE溶解バッファー中に再懸濁された。2D-DIGEを実施する前に、タンパク質試料はシアニン色素Cy2、Cy3およびCy5のN-ヒドロキシサクシニミジルエステル誘導体で標識された。手短に言えば、150 μ gのタンパク質試料は、同一2-DE上での比較のために375pmolのCy3またはCy5のいずれかで最小限に標識された。画像マッチングおよびクロスゲル統計比較を促進するために、すべての試料のプールも調製され、すべてのゲルについての内部標準として1 μ gのタンパク質あたり2.5pmol Cy2のモル比のCy2で標識された。このようにして、3通りの試料および内部標準を流し複数の2-DE上で定量化することができた。標識化反応は暗所において氷上で30分間実施され、次に20倍モル比過剰なフリーL-リジンで10分間クエンチされた。次に、差次的にCy3-およびCy5標識された試料はCy2-標識内部標準と混合され、ジチオスレイトールで30分間還元された。IPGバッファー、pH4~7非線形(2%(v/v)、GE Healthcare)が添加され、最終容積は再水和のために2D-溶解バッファーで350 μ lに調整された。固定化pH勾配(IPG)ストライプ(18cm pH4~7直線勾配)は50Vで12時間、試料(350 μ LのIEFバッファー中150 μ gのタンパク質)と活発に再水和され、続いて250、500および1000Vでそれぞれ1時間、次に20、45kVhで10000Vからなる急速電圧ランピングが行われた。等電点電気泳動は20で合計62.5kV-hで実施された。ストライプは、6M尿素、30%(v/v)グリセリン、4%SDS(w/v)、100mM Tris-HCl(pH8.8)、65mMジチオスレイトール中で20分間、次に240mMヨードアセトアミドを含有する同一バッファー中でさらに20分間平衡化された。平衡化されたIPGストライプは20x20cm 10%ポリアクリルアミドゲル上に移された。ゲルは、2(n-モルフォリノ)エタンスルホン酸(MES)ランニングバッファーを用いてProtean(登録商標)IXLシステム(Bio-Rad)上、90Vで一晩流された。続いて、ゲルはTyphoon可変モード撮像装置9210(GE Healthcare)を使用してスキャンされた。CyDye染色により可視になる大部分のスポットは通常、Shevchenko et al.(Anal Chem 1996年、68:850~858頁)のプロトコールに従えば、銀染色により可視になる。

【0045】

10

20

30

40

50

ゲル内消化およびペプチド抽出：ゲル染色が完了すると、個々のバンドはゲルから切り取られた。ゲル内消化およびペプチド抽出は、以前の改良プロトコールを使用して達成された (Zhang et al., J Proteome Res 2007年、6: 2295 ~ 2303頁)。手短に言えば、cTnIバンドは切り取られ、1 mm³片に切断され、50%アセトニトリル / 25 mM炭酸水素アンモニウムを用いて15分間振盪しながら3回洗浄された。ゲル片は25 mM炭酸水素アンモニウム + 10 mMジチオスレイトールと一緒に55 で60分間インキュベートされ、アセトニトリル (ACN) で洗浄され、次に20 mM炭酸水素アンモニウム + 55 mMヨードアセトアミド (作り立て) と一緒に暗所で30分間インキュベートされた。ゲル片はアセトニトリルで洗浄され、風乾され、25 mM炭酸水素アンモニウム中で12.5 ng / μ Lトリプシン (Promega、シークエンシング等級、Madison, WI) を用いて再水和され、次に37 で18時間または一晩インキュベートされた。その液体は清潔なチューブに移された。ペプチドは、25 で20分間50% ACN + 0.1 TFA% を使用し、続いて20分間の振盪、1分間の遠心分離および前段階由来の液体を用いた2度の抽出を組み合わせて、二度抽出された。

10

【0046】

免疫ブロッティング解析：タンパク質試料はLaemmliバッファー (50 mM Tris HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10%グリセリン、プロモフェノールブルー) に、5% -メルカプトエタノールと一緒に溶解され95 で5分間インキュベートされた。試料は10% Tris HCl ポリアクリルアミドゲル (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 上に充填され、電気泳動は150 Vを70分間印加することにより実施された。SDS-PAGE後、マウス由来の分離されたタンパク質はニトロセルロース膜 (Millipore, USA) にプロットされた。転写は、電気泳動転写用のセルにおいて60分間、100 Vの定電圧設定で、25 mM Tris、192 mMグリシンおよび10%容積分率のメタノール、pH = 8.3を含有するバッファー中で実施された。ニトロセルロースプロット上のシトルリン化タンパク質の存在は、製造業者のプロトコールに従って、抗修飾シトルリン (AMC) 検出キット (Upstate, Charlottesville, VA, USA) を使用して検出された。

20

【0047】

in situでのシトルリン化タンパク質の検出：シトルリン化タンパク質の免疫染色は、抗修飾シトルリン IgGポリクローナル抗体を使用することにより実施された。手短に言えば、シトルリン化染色のためのスライドは、37 で3時間、アンチピリンおよび2, 3-ブタンジオンを含有する強酸液中で改変された。内在性ペルオキシダーゼ活性は、メタノール中0.3% H₂O₂中での18分間のインキュベーションにより遮断された。非特異的タンパク質活性は、非血清タンパク質溶液 (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) と一緒にインキュベーションにより遮断された。シトルリン染色についての点数化も、最小、中程度および顕著なシトルリン化染色に従って5ポイントスケール (0.5増加で1~3) を使用して盲検で実施された。

30

【0048】

結果：我々のデータは、シトルリン化が心筋で起こることを示している。我々は健康様疾患試料においてシトルリン化タンパク質を検出した。同様に、それぞれの不活性な (exanimate) 画分において修飾されたタンパク質を見出した。興味深いことに、アクチンとの周期的歯止め様相互作用を通じて筋節短縮を推進する分子モーターであるミオシンおよびトロポミオシンにおいて少数のシトルリン化残基を見出した。したがって、心筋タンパク質がシトルリン化されると心不全において心機能に影響を及ぼすことができると思われる。

40

【0049】

タンデム質量分析によるタンパク質シトルリン化の in vivo 標的解析：我々は、タンデムMS/MSによるシトルリン含有ペプチドの特定の検出および同定のために2, 3-ブタンジオンおよびアンチピリン修飾を調べた。適用された条件下では、2, 3-ブ

50

タンジオン/アンチピリンによる修飾はシトルリンに絶対的に特異的である。この条件下では、ヒト心筋の未処理細胞成分画分においていくつかのタンパク質を同定することができた(表1 Aおよび1 B)。興味深いことに、いくつかの修飾された部位は対照と比べてHFにより特異的であると思われる(図1)。

【0050】

シトルリン化はヒト心臓組織において起こる：我々の仮説を支持するために、シトルリン化タンパク質の存在についてヒト心臓組織を調査した。シトルリン化タンパク質に対する市販の抗体(抗シトルリン(修飾)検出キット、Millipore)を使用して、シトルリン化タンパク質がヒト心臓組織に存在することを確証した(図2 a)。さらに、我々は免疫組織化学を使用して心臓組織においてシトルリン化の位置を突き止める(図2 b)。図2 aに示されるように、2個の主要タンパク質、ミオシンおよびアクチンは比較された群内では異なる作用をする。HF組織では、対照と比べてミオシン重鎖シトルリン化の有意な増加が見られた。一方、アクチンはミオシンとは反対のパターンを示した。さらに、対照心臓組織のIHC染色により、ヒト心臓組織におけるシトルリン化タンパク質の存在が証明された。

10








【0051】

DIGEおよび質量分析：9個のゲルのDIGE画像により変動スポットの位置確認が可能になった。CyDyes染色により検出されるスポットは切り取られ、同定に供された。全体で、9個のゲル上で最大25個の異なるスポットが検出された。Orbitrap LTQを使用して、それぞれのスポットのゲル内消化後にペプチドを解析した。全体で25個のタンパク質スポットのうち、7個のスポットのみが同定に成功した。表4は同定されたタンパク質を示している。

20

【表4】

表4. 7個のタンパク質の概要

| ゲル表示 | MS/MS ID* | 受入番号 | カバー度 % | 観察された pI/MW | 理論的 pI/MW | P < 0.05 |
|---|--------------------|--------|-----------|----------------|------------------|----------|
|  | 脂肪酸結合 タンパク質、心臓 | P05413 | 63.2 | 6.0/14.500 | 6.29/14.858 | 0.20* |
|  | L-乳酸デヒドロ ゲナーゼB鎖 | P07195 | 35.9 | 5.8/36.000 | 5.71/36.638 | 0.13* |
|  | ビンキュリン | P18206 | 4.5 | 6.2/170.00 | 5.83/ 123.799 | 0.19* |
|  | アクチン、 アルファ心臓性 | P62736 | 30.1 | 5.5/44.000 | 5.24/42.009 | 0.020 |
|  | トロポミオシン | P09493 | 6.2 | 4.6/38.000 | 4.69/32.709 | 0.0020 |
|  | ミオシン軽鎖 | P08590 | 32 | 5.0/24.000 | 5.03/21.932 | 0.021 |
|  | ミオシン調節軽鎖2 | P10916 | 39.8 | 4.9/18.000 | 4.92/18.789 | 0.0018 |

30

40

* 統計的に有意ではない

本願の出願当初の請求項の記載を、実施の態様として、以下に付記する。

(1)

対象における循環器病を診断する方法であって、(a)前記対象から生体試料を得ることおよび(b)前記対象から得られた前記生体試料におけるシトルリン化タンパク質の存

50

在を検出することを含み、シトルリン化タンパク質のレベルが循環器病を示している方法。

(2)

前記シトルリン化タンパク質が、前記シトルリン化タンパク質の対照量と比べて上昇している、(1)に記載の方法。

(3)

前記生体試料が、血液、血漿、血清および組織生検からなる群から選択される、(1)に記載の方法。

(4)

前記組織生検が心筋組織である、(2)に記載の方法。

10

(5)

前記シトルリン化タンパク質が、アルギニン残基からシトルリンへの翻訳後変換を含む、(1)に記載の方法。

(6)

前記シトルリン化タンパク質が、ミオシン重鎖、ミオシン結合タンパク質C、トロポミオシン 1、トロポミオシン 3、アクチン、タイチン、リポタンパク質リパーゼ、L-乳酸デヒドロゲナーゼB鎖、アルファ-1-抗キモトリプシン、カスパーゼ動員ドメイン含有タンパク質10、ジンクフィンガーZZ型およびEF-ハンドドメイン含有タンパク質1からなる群から選択される、(1)に記載の方法。

(7)

前記シトルリン化タンパク質が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16および配列番号17からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、(1)に記載の方法。

20

(8)

前記シトルリン化タンパク質が、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33および配列番号34からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、(1)に記載の方法。

30

(9)

前記シトルリン化タンパク質の存在が、質量分析、高分解能質量分析、タンデム質量分析、結合アッセイ、免疫アッセイ、抗体結合または免疫組織化学を使用して検出される、(1)に記載の方法。

(10)

対象におけるシトルリン化タンパク質に対する自己免疫に対する感受性を診断する方法であって、(a)前記対象から生体試料を得ることおよび(b)前記対象から得られた前記生体試料におけるシトルリン化タンパク質の存在を検出することを含み、シトルリン化タンパク質のレベルが循環器病を示している方法。

(11)

前記シトルリン化タンパク質が、前記シトルリン化タンパク質の対照量と比べて上昇している、(10)に記載の方法。

40

(12)

前記生体試料が、血液、血漿、血清および組織生検からなる群から選択される、(10)に記載の方法。

(13)

前記組織生検が心筋組織である、(12)に記載の方法。

(14)

前記シトルリン化タンパク質が、アルギニン残基からシトルリンへの変換を含む、(10)に記載の方法。

50

(1 5)

前記シトルリン化タンパク質が、ミオシン重鎖、ミオシン結合タンパク質C、トロポミオシン 1、トロポミオシン 3、アクチン、タイチン、リポタンパク質リパーゼ、L-乳酸デヒドロゲナーゼB鎖、アルファ-1-抗キモトリプシン、カスパーゼ動員ドメイン含有タンパク質10、ジンクフィンガーZZ型およびEF-ハンドドメイン含有タンパク質1からなる群から選択される、(10)に記載の方法。

(1 6)

前記シトルリン化タンパク質が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16および配列番号17からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、(10)に記載の方法。

10

(1 7)

前記シトルリン化タンパク質が、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33および配列番号34からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、(10)に記載の方法。

(1 8)

前記シトルリン化タンパク質の存在が、質量分析、高分解能質量分析、タンデム質量分析、結合アッセイ、免疫アッセイ、抗体結合または免疫組織化学を使用して検出される、(10)に記載の方法。

20

(1 9)

PAD活性の阻害剤を、それを必要とする対象に投与することにより、ペプチジルアルギニンデアミナーゼアイソフォーム1(PAD1)、アイソフォーム2(PAD2)および/またはアイソフォーム4(PAD4)の活性を調節する方法。

(2 0)

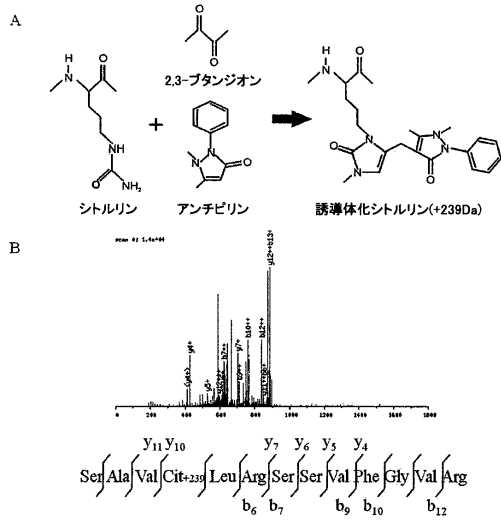
前記阻害剤が、F-アミジン[N- -ベンゾイル-N5-(2-フルオロ-1-イミノエチル)-1-オルニチンアミド]、2-クロロアセトアミジンおよびC1-アミジン[N- -ベンゾイル-N5-(2-クロロ-1-イミノエチル)-1-オルニチンアミド]からなる群から選択される、(19)に記載の方法。

30

【 図 1 】

図 1

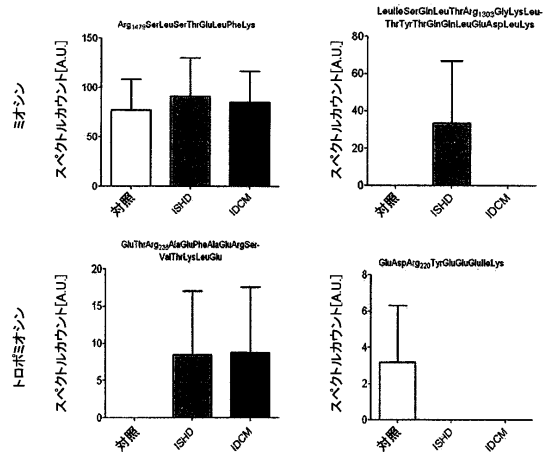
Figure 1



【 図 2 】

図 2

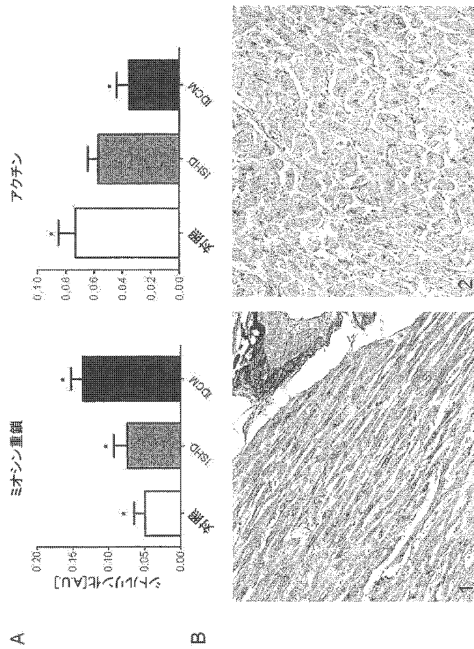
Figure 2



【 図 3 】

図 3

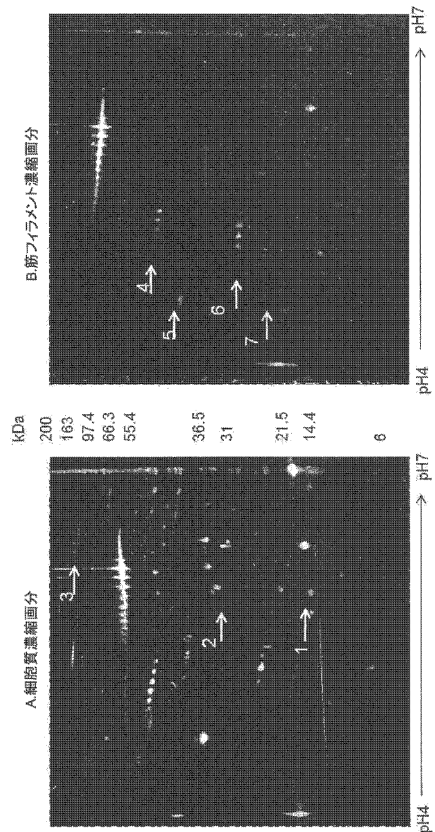
Figure 3



【 図 4 】

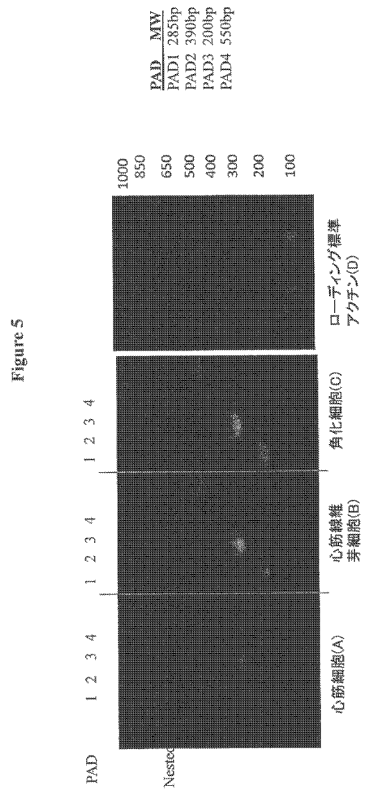
図 4

Figure 4



【 図 5 】

図 5



【 配列表 】

0005701994000001.app

フロントページの続き

| | | |
|--------------------------|--|----------------|
| (51)Int.Cl. | | F I |
| A 6 1 K 31/16 (2006.01) | | A 6 1 K 31/16 |
| A 6 1 K 31/155 (2006.01) | | A 6 1 K 31/155 |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | | A 6 1 P 9/00 |

(74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克

(72)発明者 フェルト・ポベル、ジャスティナ・ピー、
アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2 3 1、バルティモア、イー・プラット・ストリート
1 9 3 1、アパートメント 3

(72)発明者 ファン・アイク、ジェニファー・イー、
アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2 3 9、バルティモア、ローク・ラベン・ブルバード
6 6 0 7

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2010/104964(WO, A1)
国際公開第2009/103988(WO, A1)
特表2007-524100(JP, A)
特表2009-510464(JP, A)
国際公開第2010/005293(WO, A1)
Chang X, Yamada R, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Yamamoto K., Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue., Rheumatology (Oxford)., 2005年, Vol.44, No.11, Page.1374-1382
Chang X, Han J, Pang L, Zhao Y, Yang Y, Shen Z., Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors., BMC Cancer., 2009年 1月30日, Vol.9, Page.40

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
B I O S I S (S T N)
C A p l u s (S T N)
E M B A S E (S T N)
M E D L I N E (S T N)

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 瓜氨酸化蛋白质：心肌蛋白质的翻译后修饰，作为生理和病理疾病的标志物 | | |
| 公开(公告)号 | JP5701994B2 | 公开(公告)日 | 2015-04-15 |
| 申请号 | JP2013538979 | 申请日 | 2011-11-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 约翰霍普金斯大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 约翰·霍普金斯大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 约翰·霍普金斯大学 | | |
| [标]发明人 | フェルトボベルジャスティナピー ファンアイクジェニファーイー | | |
| 发明人 | フェルト-ボベル、ジャスティナピー、 ファン・アイク、ジェニファー・イー。 | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/53 G01N27/62 A61K45/00 A61P43/00 A61K31/16 A61K31/155 A61P9/00 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/34 G01N33/564 G01N33/6812 G01N33/6848 G01N33/6893 G01N2440/18 G01N2800/32 G01N2800/50 | | |
| FI分类号 | G01N33/68.ZNA G01N33/53.D G01N27/62.V A61K45/00 A61P43/00.111 A61K31/16 A61K31/155 A61P9/00 | | |
| 代理人(译) | 中村 诚 | | |
| 优先权 | 61/412819 2010-11-12 US | | |
| 其他公开文献 | JP2014503795A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本文公开了用于诊断心血管疾病的方法。该方法包括检测瓜氨酸化蛋白质。

| コード番号 | 種類 | ID番号 | 性別 | 年齢 | LVEF(%) |
|-------|------|-------|----|----|---------|
| 1 | ISHD | 3.062 | M | 31 | 23 |
| 2 | ISHD | 3.007 | M | 45 | - |
| 3 | ISHD | 2.063 | M | 46 | 25 |
| 4 | ISHD | 3.123 | M | 47 | 20 |
| 5 | ISHD | 3.078 | M | 50 | - |
| 6 | ISHD | 3.106 | M | 52 | - |
| 7 | ISHD | 3.105 | M | 54 | - |
| 8 | ISHD | 3.143 | M | 54 | - |
| 9 | ISHD | 3.075 | F | 43 | - |
| 10 | ISHD | 3.103 | F | 49 | - |
| 11 | IDCM | 2.092 | M | 43 | - |
| 12 | IDCM | 3.104 | M | 46 | - |
| 13 | IDCM | 3.138 | M | 56 | 15 |
| 14 | IDCM | 2.095 | M | 57 | 10 |
| 15 | IDCM | 4.098 | M | 58 | 20 |
| 16 | IDCM | 4.058 | M | 60 | 15 |
| 17 | IDCM | 3.096 | F | 23 | 15 |
| 18 | IDCM | 3.159 | F | 31 | 20 |
| 19 | IDCM | 2.111 | F | 53 | 20 |
| 20 | IDCM | 2.115 | F | 54 | 22 |
| 21 | ドナー | 4.015 | M | 19 | - |
| 22 | ドナー | 2.152 | M | 23 | - |
| 23 | ドナー | 4.013 | M | 23 | - |
| 24 | ドナー | 3.135 | M | 26 | - |
| 25 | ドナー | 3.145 | M | 39 | - |
| 26 | ドナー | 2.149 | M | 44 | - |
| 27 | ドナー | 3.141 | M | 52 | - |
| 28 | ドナー | 3.084 | F | 27 | - |
| 29 | ドナー | 3.073 | F | 41 | - |
| 30 | ドナー | 3.056 | F | 45 | - |