

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6535385号
(P6535385)

(45) 発行日 令和1年6月26日(2019.6.26)

(24) 登録日 令和1年6月7日(2019.6.7)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A P
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 O 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10

請求項の数 17 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-542865 (P2017-542865)	(73) 特許権者	517280937
(86) (22) 出願日	平成28年2月5日(2016.2.5)		ウォンメディカル コーポレーション
(65) 公表番号	特表2018-513353 (P2018-513353A)		大韓民国 14542 キョンギード プ
(43) 公表日	平成30年5月24日(2018.5.24)		チョン-シ ソンネーデロ 265ボン-
(86) 国際出願番号	PCT/KR2016/001301		ギル 67 704ホ
(87) 国際公開番号	W02016/129890	(74) 代理人	110000796
(87) 国際公開日	平成28年8月18日(2016.8.18)		特許業務法人三枝国際特許事務所
審査請求日	平成29年8月23日(2017.8.23)	(72) 発明者	カン サンウォン
(31) 優先権主張番号	10-2015-0020481		大韓民国 06517 ソウル ソチョ-
(32) 優先日	平成27年2月10日(2015.2.10)		グ ジャムウォン-ロ 166-17 4
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(72) 発明者	カン ドンファン
			大韓民国 13361 キョンギード ソ
			ンナム-シ チュンウォン-グ クワンミ
			ョン-ロ 114 1102ホ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管疾患診断用バイオマーカー及びその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液サンプルから平滑筋細胞マーカーを用いて収集または分離された平滑筋細胞由来の細胞外小包 (extracellular vesicle) のインターロイキン12受容体 2 (interleukin 12 receptor 2) タンパク質のレベルを測定する製剤を含む、血管疾患診断用組成物。

【請求項2】

前記血管疾患診断用の組成物が、平滑筋細胞マーカーに特異的に結合する抗体またはアプタマーをさらに含むものである、請求項1に記載の血管疾患診断用組成物。

【請求項3】

前記平滑筋細胞マーカーが、血小板由来成長因子受容体- (platelet-derived growth factor receptor-、PDGFR)、または -平滑筋アクチン (alpha-smooth muscle actin) である、請求項2に記載の血管疾患診断用組成物。

【請求項4】

前記組成物が、エキソソームマーカーであるCD81、CD9またはCD63に特異的な抗体またはアプタマーをさらに含むものである、請求項1~3のいずれかに記載の血管疾患診断用組成物。

【請求項5】

前記インターロイキン12受容体 2 タンパク質のレベルを測定する製剤が、インターロイキン12受容体 2 タンパク質に特異的な抗体またはアプタマーを含むものである、請求項1~4のいずれかに記載の血管疾患診断用組成物。

【請求項 6】

前記インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質が、全長 (full-length) インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の血管疾患診断用組成物。

【請求項 7】

血管疾患が、アテローム性動脈硬化症、血管再狭窄 (in-stent restenosis)、心筋梗塞または不安定狭心症である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の血管疾患診断用組成物。

【請求項 8】

前記組成物が、心臓発作の危険性がある疾患群の早期診断用に使用されるものである、請求項 7 に記載の血管疾患診断用組成物。

10

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 に記載のいずれか一項の組成物を含む、血管疾患診断用キット。

【請求項 10】

前記キットが、マイクロアレイ、アプタマーチップキット、エライザ (ELISA、enzyme linked immunosorbent assay) キット、ブロットイング (blotting) キット、免疫沈殿法キット、免疫蛍光検査キット、タンパク質チップキット及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるものである、請求項 9 に記載の血管疾患診断用キット。

【請求項 11】

(a) 血管疾患の疑いのある個体から分離された血液試料中の平滑筋細胞由来の細胞外小包を収集または分離する段階；

20

(b) 前記 (a) 段階で収集または分離された細胞外小包中のインターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質のレベルを測定する段階；及び

(c) 前記 (a) 段階で測定されたインターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質のレベルと正常対照群の試料とを比較する段階を含む、血管疾患診断のための情報提供方法。

【請求項 12】

エキソソームマーカーを用いて (a) 段階から得られた平滑筋細胞由来の細胞外小包のレベルを測定する段階をさらに含む、請求項 11 に記載の血管疾患診断のための情報提供方法。

【請求項 13】

前記エキソソームマーカーが、CD 8 1、CD 9 または CD 6 3 である、請求項 12 に記載の血管疾患診断のための情報提供方法。

30

【請求項 14】

前記 (a) 段階の血液試料が、血漿試料である、請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の血管疾患診断のための情報提供方法。

【請求項 15】

前記平滑筋細胞由来の細胞外小包を収集または分離する (a) 段階が、平滑筋マーカーに特異的に結合する抗体またはアプタマーを用いて行うものである、請求項 11 ~ 14 のいずれかに記載の血管疾患診断のための情報提供方法。

【請求項 16】

前記血管疾患の疑いのある個体から分離された血液試料から収集または分離された平滑筋細胞由来の細胞外小包から測定されたインターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質のレベルが、正常対照群の試料より高い場合、前記個体が血管疾患を有するとの情報を提供する、請求項 11 ~ 15 のいずれかに記載の血管疾患診断のための情報提供方法。

40

【請求項 17】

前記血管疾患が、心筋梗塞、急性冠症候群または不安定狭心症である、請求項 11 ~ 16 のいずれかに記載の血管疾患診断のための情報提供方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液中インターロイキン 1 2 受容体 2 (interleukin12 receptor 2) タ

50

ンパク質のレベルを測定する製剤を含む、血管疾患診断用組成物及びこれを含む血管疾患診断用キットに関する。また、本発明は、血管疾患の疑いのある個体から分離された血液試料中のインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定する段階を含む、血管疾患診断のための情報提供方法に関する。さらに、本発明は、インターロイキン12受容体2活性の阻害剤を含む血管疾患の予防または治療用組成物、及び血管疾患治療のための候補物質で平滑筋細胞に処理する段階及びインターロイキン12受容体2の発現レベルを測定する段階を含む、血管疾患治療剤のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アテローム性動脈硬化症は、欧米諸国では死亡率の約50%を占めている二つ疾患である、冠動脈疾患及び脳血管疾患の初期原因として知られている。アテローム性動脈硬化症の初期病変はいわゆる「脂肪線条(fatty streak)」病変と代表される内皮下脂質蓄積マクロファージ(泡沫細胞、foam cells)の蓄積が起こる。脂肪線条は医学的に有害なものではないが、脂質豊富壊死破片及び平滑筋細胞(smooth muscle cells、SMCs)の蓄積を特徴とする、進展した形態の繊維性及びプラーク型病変の前駆体であり得る。

10

【0003】

病気が進行されている間に、動脈血管壁は徐々に厚く、かつ、硬くなって、アテローム性動脈硬化性プラークを形成し、そのため、動脈内の面積は狭くなる。これらの動脈血管の内膜肥厚による血管内径の狭窄がさらに進み、プラークが壊れやすい状態になると不安定狭心症(unstable angina)が伴われる。続いて、プラークが突然破裂して虚血性の症

20

【0004】

血管内膜肥厚による狭窄部位が確認されると、血管内径の狭窄を除去して血管を拡張するために、ステントや経皮的冠動脈形成術を含む血管形成術を通じた血管介入(vascular intervention)手術を行うことが一般的であるが、前記のような手術後に血管内皮細胞が剥離されて、血管平滑筋細胞の過増殖による血管内膜肥厚症状として再狭窄の症状が再び発生することがある。これに当該分野では、血管内膜肥厚症状を非侵襲的に容易に診断

30

【0005】

これまでヒト由来試料及び動物モデルで、アテローム性動脈硬化症の早期診断バイオマーカーを同定するための数多くの試みがあった。フレイミンハム心臓研究における、7年以上の期間の間に3,209人の参加者に対して追跡(follow-up)研究した臨床データを介して数個の有意なバイオマーカー[C反応性タンパク(C-reactive protein)、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP、B-type natriuretic peptide)、レニン(renin)、尿中アルブミン(urinary albumin)及びホモシステイン]を明らかにした。病気の進行と関連する循環バイオマーカーを見つけるための血清プロテオミクス及びメタボロミクス実験が数年間積極的に進められてきた。それにもかかわらず、すべて個人差及び血管肥厚症

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Kohler & Milstein (1976) European Journal of Immunology 6: 511-519

【非特許文献2】Clackson et al, Nature, 352: 624-628, 1991

【非特許文献3】Marks et al. J. Mol. Biol., 222: 58, 1-597, 1991

【非特許文献4】DH Kang, et al., Circulation 2013; 128: pp 834-844

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

前記のような背景下、本発明者らは、遺伝子的に類似遺伝子型のラットの風船形成術による頸動脈損傷血管に対する差動プロテオミクス分析(differential proteomics strategy)を適合させ、ヒト大動脈平滑筋細胞(human aortic SMCs、HASMCs)を用いた試験管内(in vitro)検証により、平滑筋細胞肥大症とは関係ないタンパク質を除外した。その後、試験管内及び生体内(in vivo)検証を通じて新生内膜平滑筋肥大症との関連性が知られてなかった候補タンパク質を同定した。その結果、血清に存在するインターロイキン12受容体2タンパク質が血斑(plaque)不安定性から起因する臨床徴候との関連性を発見し、血液中インターロイキン12受容体2タンパク質を血管疾患のバイオマーカーとして用いられることを確認し、本発明を完成した。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の一つの目的は、血液中インターロイキン12受容体2(interleukin 12 receptor 2)タンパク質のレベルを測定する製剤を含む、血管疾患診断用組成物を提供することにある。

【0009】

本発明の他の目的は、前記血管疾患診断用組成物を含む、血管疾患診断用キットを提供することにある。

20

【0010】

本発明のもう一つの目的は、血管疾患の疑いのある個体から分離された血液試料中のインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定する段階を含む、血管疾患診断のための情報提供方法を提供することにある。

【0011】

本発明のもう一つの目的は、インターロイキン12受容体2活性の阻害剤を含む、血管疾患の予防または治療用組成物を提供することにある。

【0012】

本発明のもう一つの目的は、血管疾患治療のための候補物質で平滑筋細胞に処理する段階及びインターロイキン12受容体2の発現レベルを測定する段階を含む、血管疾患治療剤のスクリーニング方法を提供することにある。

30

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、インターロイキン12受容体2を血管疾患、特に心筋梗塞または不安定狭心症に対するバイオマーカーとして使用する場合、既存の血管造影術のみで診断が可能であった血管疾患に対して、血液を用いた非侵襲的であり、かつ経済的に急速な診断が可能となる。従って、疾病が悪化され虚血症状の出現後の自覚症状により診断していた血管疾患分野での早期診断が可能になることにより、従来は不可能であった早期及び予防治療を実現することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

40

【0014】

【図1】風船形成術によって損傷した頸動脈から新生内膜組織を染色して回復時間帯別の肥厚症動態を確認した結果である。

【図2a】風船形成術を用いて頸動脈損傷モデルを製造した後、得られた損傷した頸動脈組織からタンパク質を抽出して、2D-差動電気泳動(2-dimensional differential gel electrophoresis、2D-DIGE)を介してプロテオミクス分析を行う実験過程を示した模式図である。

【図2b】風船形成術を用いて頸動脈損傷モデルを製造した後、得られた損傷した頸動脈組織から細胞小器官を分画した試料をマーカーで確認した結果である。

【図2c】血管損傷後の回復時間帯別に収得した頸動脈組織の抽出液における、各同定さ

50

れたタンパク質の差動発現をそれぞれに特異的な抗体を用いて免疫プロットにより確認した結果である。

【図3 a】風船形成術を用いて頸動脈損傷モデルを製造した後、得られた傷ソングイした頸動脈組織から細胞質タンパク質（S-100分画）を抽出して2D-差動電気泳動（2-dimensional differential gel electrophoresis、2D-DIGE）を実施したゲルの代表的な蛍光画像である。

【図3 b】風船形成術を用いて頸動脈損傷モデルを製造した後、得られた損傷した頸動脈組織からタンパク質を抽出し、2D-差動電気泳動（2-dimensional differential gel electrophoresis、2D-DIGE）を介してプロテオミクス分析を行い、同定されたタンパク質スポット（spot）の中でインターロイキン12受容体2タンパク質を確認した結果である。グラフは、蛍光画像分析によって定量されたインターロイキン12受容体2タンパク質の発現増加を損傷後の回復時間ごとに示す。

【図4】IL-12R2のノックダウン後、3つのSMC細胞活性（ヒト大動脈平滑筋細胞の増殖と走化性の移動、平滑筋細胞に対する単核球の付着）に及ぼす影響を確認した結果である。

【図5】頸動脈血管壁に風船形成術を用いて損傷した後、IL-12R2 siRNAを伝達した後、IL-12R2発現量を比較して（図5のA）、新生内膜組織の厚さをH&E組織染色で確認してグラフ化（図5のB）した図である。

【図6 a】本発明で使用する抗IL-12R2抗体の抗原特異性をU937細胞株で内生的に発現されたIL-12R2タンパク質を用いて、免疫プロットで確認した結果である。

【図6 b】血漿サンプルにおける微量タンパク質の検出を改善するために、Pierceアルブミン/IgG除去キットを用いて患者の血漿サンプルからアルブミンと免疫グロブリンを含む豊富な血漿タンパク質を除去したことを確認した図である。ろ過された画分2は図7で使用されたサンプルである。

【図7】正常群と安定狭心症または急性心筋梗塞を有する患者から取得した血漿サンプルをIL-12R2タンパク質に対してウェスタンブロット分析を行った結果（図7のA）と、正常群と安定狭心症または急性心筋梗塞を有する患者から取得した血漿サンプルをIL-12R2タンパク質に対してウェスタンブロット分析を行った結果である（図7のB）。図7のCは、正常群と不安定狭心症の患者から取得した血漿サンプルをIL-12R2タンパク質に対してウェスタンブロット分析を行った結果である。PonS染色により、等量のタンパク質がローディングされたことを示す。矢印はIL-12R2タンパク質の位置を示す。

【図8 a】正常群と安定狭心症（SA）、不安定狭心症（UA）または急性心筋梗塞（AMI）を有する患者から取得した血漿サンプルに対する、IL-12R2タンパク質の発現レベルを示した図7のIL-12R2タンパク質バンドの定量及び統計分析したグラフである。

【図8 b】病理学的内膜肥厚症を伴うヒト患者（n=3）の頸動脈血管におけるIL-12R2に対する組織染色した図である。

【図9 a】急性心筋梗塞及び不安定狭心症の患者から取得した血漿サンプルを超遠心分離を用いて細胞外小包分画を分離し、IL-12R2、エキソソームマーカーであるCD9及びCD81をウェスタンブロットで確認した図である。

【図9 b】急性心筋梗塞及び不安定狭心症の患者から取得した血漿サンプルをポリマーベース沈殿（polymer-based precipitation）を用いて細胞外小包分画を分離し、IL-12R2、エキソソームマーカーであるCD81及び平滑筋マーカーであるPDGFRをウェスタンブロットで確認した図である。

【図9 c】急性心筋梗塞及び不安定狭心症の患者から取得した血漿サンプルにおけるPDGFRを免疫沈殿（immunoprecipitation）して、沈殿物におけるIL-12R2をウェスタンブロットで確認した結果である。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

前記目的を達成するための一つの様態として、本発明は血液中インターロイキン 1 2 受容体 2 (interleukin12 receptor 2) タンパク質のレベルを測定する製剤を含む、血管疾患診断用組成物を提供する。

【 0 0 1 6 】

本発明における用語、「血管疾患」は、血管組織の損傷が起こり、そのため血管内膜が厚くなる症状を有する疾患を制限なく含む。本発明の血管疾患に該当する場合、前記した血管内膜肥厚が進むにつれて、血管の狭窄が起こることがあり、血管壁の弾力が低下し、血管破裂による出血が発生することがある。本発明において、血管疾患は血管肥厚症、不安定狭心症 (unstable angina)、心筋梗塞 (acute myocardial infarction)、アテローム性動脈硬化症、血管再狭窄 (in-stent restenosis) であってもよいが、これに限定されない。

10

【 0 0 1 7 】

本発明においては、血液中インターロイキン 1 2 受容体 2 は、損傷されて血管内膜の肥厚症状を現すバイオマーカーであり、不安定狭心症 (unstable angina)、心筋梗塞 (acute myocardial infarction) などの心臓発作のリスクのある疾患群を診断しうることを確認した。従って、血液中インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質を測定することにより、すなわち、本発明の血管疾患予測または診断用組成物を用いて、危険性の早期診断を達成するために使用され得る。

【 0 0 1 8 】

本発明における用語、「インターロイキン 1 2 受容体 2 (interleukin 12 receptor 2、IL-12R 2)」は、インターロイキン 1 2 リガンドに結合する受容体タンパク質のサブユニット 2 を意味する。該当タンパク質は、J A K 2 / S T A T 4 経路に關与し、T細胞とNK細胞の増殖を促進する機能をし、特にT細胞をT h 1 細胞への分化を促進することが知られている。本遺伝子またはタンパク質に対する情報は公知のデータベースから取得することができ、その例としてN C B I G e n B a n k であってもよいが、これに限定されない。本発明において、インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質は、全長 (full-length) ヒトインターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質であってもよく、配列番号 1 のアミノ酸配列で構成されているものであってもよい。

20

【 0 0 1 9 】

本発明の血管疾患診断用組成物は、インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質に特異的な抗体またはアプタマーを含むことができる。特に、本発明におけるインターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質に特異的な抗体はサンタクルーズバイオテック社 (Santa Cruz Biotech.)、クローン E - 2 0、カタログ # s c - 1 8 6 4 8 及び/またはアトラス抗体社 (Atlas antibodies)、製品 # H P A 0 2 4 1 6 8 であってもよい。

30

【 0 0 2 0 】

本発明の具体的な一実施例では、インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質に特異的な抗体として、サンタクルーズバイオテック社、クローン E - 2 0、カタログ # s c - 1 8 6 4 8 及び/またはアトラス抗体社、製品 # H P A 0 2 4 1 6 8 を使用してインターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質レベルを測定した。

40

【 0 0 2 1 】

一方、本発明の血管疾患診断用組成物は、血液中における血管内膜の平滑筋細胞由来インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質のレベルを測定するものであってもよい。

【 0 0 2 2 】

インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質は、インターロイキン 1 2 リガンドに結合する受容体タンパク質のサブユニットに該当する。特に、インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質は膜通過タンパク質として細胞膜に存在するのが一般的であるため、該当タンパク質が血液中に存在するかについては知られていない。本発明では、血液中のインターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質のレベルを測定することができるということだけではなく、インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質の血管疾患、例えば、不安定狭心症

50

、心筋梗塞などとの関連性に関しては、本発明者らが初めて究明した。

【0023】

本発明では、血液で発見されたインターロイキン12受容体2タンパク質は、血管肥厚症によって損傷した血管内膜の細胞、すなわち、平滑筋(Smooth muscle cells、SMCs)由来であってもよい。つまり、血管肥厚症が起こる損傷した血管内膜でインターロイキン12受容体2タンパク質が過発現され、損傷した組織に由来する細胞外小包(エキソソームなど)に膜タンパク質であるインターロイキン12受容体2タンパク質が含まれることがあり、前記細胞外小包は血液内に存在しうることにより、血液中の前記インターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定することができる。

【0024】

本発明の血管疾患診断用組成物は、正常対照群の血液試料に比べ血管疾患、例えば、心筋梗塞または不安定狭心症を有する個体の血液試料から差動的レベルを有するインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定する製剤を含むことによって、個体の血管疾患の有無を判断できるようにする。すなわち、本発明の組成物を用いて測定した個体の血液中インターロイキン12受容体2タンパク質のレベルが正常対照群の血液中インターロイキン12受容体2タンパク質のレベルよりも高い場合、該当個体は、血管疾患と判断することができる。

【0025】

本発明の具体的な一実施例では、正常対照群、血管内膜肥厚症や心臓発作のリスクが低い安定狭心症(stable angina)と不安定狭心症及び心筋梗塞患者群の血液試料からインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定した。その結果、正常人のサンプルと比較して、患者のサンプルからIL-12R2タンパク質が著しく高いレベルで発現されていることを確認した(図7及び図8a)。

【0026】

本発明で前記血管内膜の平滑筋細胞由来インターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定する組成物は、i)インターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定する製剤はインターロイキン12受容体2タンパク質に特異的な抗体またはアプタマー;及びii)平滑筋マーカーに特異的に結合する抗体またはアプタマーを含んでもよい。また、本発明の組成物は、前記i)とii)にiii)細胞外小包マーカーに特異的に結合する抗体またはアプタマーをさらに含むものであってもよい。

【0027】

具体的には、前記平滑筋マーカーは、血小板由来成長因子受容体(platelet-derived growth factor receptor、PDGFR)であってもよいが、これに限定されない。

【0028】

本発明の一態様であり、血液中の血管内膜の平滑筋細胞由来インターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定するために、まず、血液で平滑筋細胞マーカーに特異的に結合する抗体またはアプタマーを用いて、当該マーカーを含む細胞外小包を分離した後、当該細胞外小包においてインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定することができる。

【0029】

本発明の具体的な一実施例では、代表的に平滑筋マーカー、PDGFRに特異的に結合する抗体(サンタクルーズバイオテック社、クローンP-20、カタログ#sc-339)を用いており、これを利用して分離したエキソソームでインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定した(図9c)。

【0030】

本発明で、前記血液中インターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定することは、血液に存在する細胞外小包(extracellular vesicle)のインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定することであってもよく、前記細胞外小包は、特にエキソソーム(exosome)であってもよいが、これに限定されない。

【0031】

そのため、本発明の組成物は、細胞外小包マーカー、特にエキソソームマーカーに特異的な抗体またはアプタマーを含んでもよく、前記エキソソームマーカーはCD81、CD9またはCD63であってもよい。前記エキソソームマーカーに特異的な抗体として、CD63に特異的に結合する抗体であるシステムバイオサイエンス社 (System Biosciences Inc.)、カタログ#EXOAB-CD63A-1、CD9に特異的に結合する抗体であるシステムバイオサイエンス社、カタログ#EXOAB-CD9A-1及び/またはCD81に特異的に結合する抗体であるシステムバイオサイエンス社、カタログ#EXOAB-CD81A-1を使用してよい。本発明の目的上、前記インターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定する細胞外小包、エキソソームなどは、血管由来であってもよく、特に損傷した血管内膜由来であってもよい。本発明の具体的な一実施例では、エキソソームマーカーに特異的な抗体として、CD63に特異的に結合する抗体であるシステムバイオサイエンス社、カタログ#EXOAB-CD63A-1、CD9に特異的に結合する抗体であるシステムバイオサイエンス社、カタログ#EXOAB-CD9A-1及び/またはCD81に特異的に結合する抗体であるシステムバイオサイエンス社、カタログ#EXOAB-CD81A-1を使用した。

10

【0032】

本発明における用語、「マーカー (marker)」とは、血管疾患を有する個体、特に心筋梗塞や不安定狭心症を有する個体を、正常群個体または心臓発作非危険群個体と区別して診断することができる物質であって、本発明の血管疾患を有する個体で増加または減少を示すポリペプチド、タンパク質または核酸、脂質、糖脂質、糖タンパク質、または糖のような有機生体分子をすべて含む。特に、本発明では、本発明の血管疾患を有する個体で増加されるタンパク質であってもよいが、これに限定されない。

20

【0033】

本発明における、「タンパク質のレベルを測定」することは、本発明の血管疾患の有無を診断するために生物学的試料 (例えば、全血、血漿、血清、これらの分画など) で、前記マーカータンパク質の存在の有無と発現レベルを確認する過程であり、特に前記タンパク質に対して特異的に結合する抗体またはアプタマーを用いて、タンパク質の量を確認することができる。前記生物学的試料は、個体から分離された生物学的試料であってもよい。

【0034】

そのための分析の方法としては、ウエスタンブロット、エライザ (ELISA、enzyme linked immunosorbent assay)、放射線免疫分析 (Radioimmunoassay、RIA)、放射免疫拡散法 (radioimmunodiffusion)、オクタロニー (Ouchterlony) 免疫拡散法、ロケット (rocket) 免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈殿分析法 (Immunoprecipitation assay)、補体固定分析法 (complement fixation assay)、フローサイトメトリー分析 (Fluorescence Activated cell sorter、FACS)、アプタマーチップ (aptamer chip)、マイクロアレイ (microarray)、タンパク質チップ (protein chip) などがあるが、これに制限されるものではない。前記分析方法を介して、正常対照群での抗原抗体複合体の形成量と血管疾患の疑いのある患者からの抗原抗体複合体の形成量を比較することができ、血管疾患の疑いのある患者の実際の血管疾患の発症可否を診断することができる。

30

40

【0035】

本発明における用語、「抗体」とは、抗原性部位に対して指示される特異的なタンパク質分子を意味する。本発明の目的上、抗体はマーカータンパク質に対して特異的に結合する抗体を意味し、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体及び抗原結合性を有するものであれば、その一部もすべて含む。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊な抗体も含まれる。

【0036】

本発明の血管疾患、特に心筋梗塞または不安定狭心症に対するマーカータンパク質であるインターロイキン12受容体2タンパク質に特異的な抗体を生成することは、当業界に広く公知された技術を利用して容易に行うことができる。ポリクローナル抗体は、イン

50

ターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質抗原（全長または断片）を動物に注射し、動物から採血して抗体を含む血清を取得する、当業界に広く公知された方法によって生産することができる。これらのポリクローナル抗体はヤギ、ウサギ、ヒツジ、サル、馬、豚、牛、犬などの任意の動物種宿主から製造可能である。モノクローナル抗体は、当業界に広く公知されたハイブリドーマ方法（hybridoma method）（非特許文献 1 を参照）、またはファージ抗体ライブラリー（非特許文献 2、非特許文献 3）の技術を用いて製造されてもよい。前記方法で製造された抗体は、ゲル電気泳動、透析、塩沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーなどの方法を用いて分離、精製することができる。

【 0 0 3 7 】

また、本発明の抗体は、2つの全長の軽鎖及び2つの全長の重鎖を有する完全な形だけでなく、抗体分子の機能的な断片を含む。抗体分子の機能的な断片とは、少なくとも抗原結合機能を保有している断片を意味し、 $F a b$ 、 $F(a b')$ 、 $F(a b'')_2$ 及び $F v$ などがある。

【 0 0 3 8 】

本発明における用語、「アプタマー（aptamer）」は、一本鎖オリゴヌクレオチドであって、20～60ヌクレオチド程度の大きさであり、所定の標的分子に対する結合活性を有する核酸分子をいう。配列に応じて様々な3次元構造を有し、抗原抗体反応のように、特定の物質に対する高い親和性を有しうる。アプタマーは所定の標的分子と結合することにより、所定の標的分子を検出したり、この活性を抑制することができる。本発明のアプタマーはRNA、DNA、変形された(modified)核酸またはこれらの混合物であってもよく、また、直鎖状または環状の形態であってもよい。好ましくは、前記アプタマーはインターロイキン 1 2 受容体 2 に結合して、インターロイキン 1 2 受容体 2 を検出したり、活性を抑制する役割をすることができる。このようなアプタマーは、インターロイキン 1 2 受容体 2 の配列から当業者が公知の方法により製造することができる。

【 0 0 3 9 】

一方、本発明における用語、抗原抗体（またはアプタマー）複合体とは、前記インターロイキン 1 2 受容体 2 タンパク質とこれに特異的な抗体またはアプタマーの結合物を意味し、抗原抗体複合体の形成量は、検出ラベル（detection label）のシグナルの大きさにより定量的に測定可能である。

【 0 0 4 0 】

これらの検出ラベルは、酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子（microparticle）、レドックス分子及び放射線同位元素からなるグループから選択することができ、必ずしもこれに制限されるものではない。検出ラベルとして酵素が用いられる場合、利用可能な酵素には、 α -グルクロニダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ、ヘキソキナーゼと $G D P a s e$ 、 $R N a s e$ 、グルコースオキシダーゼとルシフェラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホスホエノールピルビン酸デカルボキシラーゼ、 α -ラクタマーゼなどがあり、これに限定されない。蛍光物には、 $F I T C$ 、 $R I T C$ 、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、 o -フタルアルデヒド、フルオレスカミンなどがあり、これに限定されない。リガンドには、ビオチン誘導體などがあり、これに限定されない。発光物には、アクリジニウムエステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼなどがあり、これに限定されない。微小粒子には、コロイド金、着色されたラテックスなどがあり、これに限定されない。レドックス分子には、フェロセン、ルテニウム錯化合物、ピオロゲン、キノン、 $T i$ イオン、 $C s$ イオン、ジイミド、1,4-ベンゾキノン、ヒドロキノン、 $K_4 W(C N)_8$ 、 $[O s(b p y)_3]^{2+}$ 、 $[R U(b p y)_3]^{2+}$ 、 $[M O(C N)_8]^{4-}$ などが含まれ、これに限定されない。放射線同位元素には、 $^3 H$ 、 $^{14} C$ 、 $^{32} P$ 、 $^{35} S$ 、 $^{36} C l$ 、 $^{51} C r$ 、 $^{57} C o$ 、 $^{58} C o$ 、 $^{59} F e$ 、 $^{90} Y$ 、

10

20

30

40

50

1 2 5 I、1 3 1 I、1 8 6 R eなどが含まれ、これに限定されない。

【0041】

タンパク質発現レベルの測定は、好ましくは、E L I S A法を用いるものである。E L I S Aは、固体支持体に付着した抗原を認知する標識された抗体またはアプタマーを利用する直接的E L I S A、固体支持体に付着した抗原を認知する抗体またはアプタマーの複合体で捕獲抗体またはアプタマーを認知する標識された抗体を利用する間接的E L I S A、固体支持体に付着した抗体またはアプタマーと抗原の複合体で抗原を認知する標識された別の抗体を利用する直接的サンドイッチE L I S A、固体支持体に付着した抗体またはアプタマーと抗原の複合体で抗原を認知する別の抗体と反応させた後、この抗体を認知する標識された二次抗体を利用する間接的サンドイッチE L I S Aなど、様々なE L I S A方法を含む。

10

【0042】

本発明における用語、「診断」は、病理学的状態の存在または特徴を確認することを意味する。本発明の目的上、診断は血管疾患、特に心筋梗塞または不安定狭心症の発症の有無、病気の進展の程度、及びこれによる心臓発作の危険性を確認することである。

【0043】

もう一つの様態として、本発明は、前記血管疾患診断用組成物を含む血管疾患診断用キットを提供する。

【0044】

本発明のキットは、血管疾患、特に心筋梗塞または不安定狭心症のマーカーであるインターロイキン12受容体 2タンパク質のレベルを確認することにより、マーカーを検出することができる。本発明のマーカー検出用キットは、インターロイキン12受容体 2タンパク質を検出することができるマイクロアレイ、アプタマーチップキット、エライザ(ELISA、enzyme linked immunosorbent assay)キット、ブロットイング(blotting)キット、免疫沈殿法キット、免疫蛍光検査キット、タンパク質チップキット及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるものであってもよい。

20

【0045】

本発明のマーカー検出用キットは、インターロイキン12受容体 2タンパク質を検出し、インターロイキン12受容体 2タンパク質のレベルを測定するためのアプタマーまたは抗体を含むことができる。

30

【0046】

もう一つの具体的な一例として、本発明でインターロイキン12受容体 2タンパク質レベルを測定するためのキットは、アプタマーまたは抗体の免疫学的検出のために基質、適度な緩衝溶液、検出ラベルで標識された抗体またはアプタマー及び/または発色基質などを含むことができる。前記の基質は、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂で合成された96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂で合成された96ウェルプレート及びガラスでできたスライドグラスなどを利用してよく、検出ラベルは、前記説明した通りである。前記の発色基質液は、A B T S (2 , 2 ' -アジノ-ビス(3 -エチルベンゾチアゾリン- 6 -スルホン酸)) またはO P D (o -フェニレンジアミン) 、 T M B (テトラメチルベンジジン) などの検出ラベルに応じて、当業界で自明に使用する基質を使用してもよい。

40

【0047】

もう一つの様態として、本発明は、血管疾患の疑いのある個体から分離された血液試料中のインターロイキン12受容体 2タンパク質のレベルを測定する段階を含む、血管疾患診断のための情報提供方法を提供する。

【0048】

具体的には、本発明は、(a) 血管疾患の疑いのある個体から分離された血液試料中のインターロイキン12受容体 2タンパク質のレベルを測定する段階；(b) 前記(a) 段階で測定されたインターロイキン12受容体 2タンパク質のレベルと正常対照群の試料とを比較する段階を含む、血管疾患診断のための情報提供方法を提供する。

【0049】

50

本発明では、血管疾患、診断、インターロイキン12受容体2などは、前記で説明した通りである。

【0050】

本発明では、前記血液試料とは、血管疾患の疑いのある個体における血管疾患を診断するために収集した血液試料（例えば、全血、血漿、血清、これらの画分など）を意味し、特に血漿試料又は細胞外小包分画であってもよいが、これに限定されない。本発明では、細胞外小包はエキソソームであってもよい。

【0051】

本発明の血管疾患診断のための情報提供方法は、血管疾患の疑いのある個体から分離された血液試料から測定されたインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルが正常対照群試料のインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルよりも高い場合、血管疾患と診断することを特徴とする。

10

【0052】

本発明の血管疾患診断のための情報提供方法は、特に、前記血管疾患の疑いのある個体から分離された血液試料中のインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定することは、血液試料に存在する血管内膜の平滑筋細胞由来インターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定するものであってもよく、これは血液試料から血管内膜の平滑筋細胞由来細胞外小包（例えば、エキソソーム）を分離または抽出して、これに存在するインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定することを介して行うことができる。

20

【0053】

本発明の一態様として、血液中の血管内膜の平滑筋細胞由来インターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定するために、まず、血液から平滑筋マーカーに特異的に結合する抗体またはアプタマーを用いて、当該マーカーを含む細胞外小包を分離した後、当該細胞外小包においてインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定することができる。

【0054】

本発明の具体的な一実施例では、代表的に平滑筋マーカーであるPDGFRに特異的に結合する抗体を用いており、これを利用して分離したエキソソームでインターロイキン12受容体2タンパク質のレベルを測定した（図9c）。

30

【0055】

もう一つの態様として、本発明は、インターロイキン12受容体2活性の阻害剤を含む、血管疾患の予防または治療用組成物を提供する。

【0056】

本発明で、血管疾患、インターロイキン12受容体2などは、前記説明した通りである。

【0057】

本発明における用語、「インターロイキン12受容体2活性阻害剤」は、インターロイキン12受容体2の発現または活性を減少させる製剤の両方を総称する意味で使用され、具体的には、インターロイキン12受容体2の発現を転写レベルで減少させたり、その活性を妨害することによりインターロイキン12受容体2の発現レベルまたは活性を減少させるすべての製剤を含むことができる。

40

【0058】

前記インターロイキン12受容体2の活性阻害剤は、インターロイキン12受容体2を標的にインターロイキン12受容体2の発現または活性を抑制することができる化合物、核酸、ペプチド、ウイルス、または前記核酸を含むベクターなど、その形態に制限なく使用可能である。前記インターロイキン12受容体2活性阻害剤は、これに限定されないが、好ましくはインターロイキン12受容体2 mRNAの発現を抑制するオリゴヌクレオチド、インターロイキン12受容体2タンパク質の活性を抑制する抗体またはその抗原結合断片であってもよい。特に、前記インターロイキン12受容体2 mRNA

50

の発現を抑制するオリゴヌクレオチドは、インターロイキン12受容体2に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー (aptamer) または siRNA であってもよい。すなわち、本発明でインターロイキン12受容体2活性阻害剤は、抗インターロイキン12受容体2タンパク質抗体、及びインターロイキン12受容体2遺伝子に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、及びmicroRNAで構成される群から選択されるものであってもよく、前記インターロイキン12受容体2遺伝子に特異的なsiRNAは、インターロイキン12受容体2 (interleukin 12 receptor 2) の塩基配列を参照して、当業界に公知された方法に基づいて製作されたものであってもよい。

【0059】

本発明の具体的な実施例では、4種のインターロイキン12受容体2遺伝子に特異的なsiRNAを風船形成術による頸動脈損傷のマウスモデルに処理して、実質的に血管内膜肥厚症状が顕著に減少することを確認した。

【0060】

本発明における用語、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、特定のmRNAの配列に相補的な核酸配列を含有しているDNAまたはRNA、またはこれらの誘導體であり、mRNA内の相補的な配列に結合してmRNAのタンパク質への翻訳を阻害する作用をする。アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、前記インターロイキン12受容体2 mRNAに相補的であり前記mRNAに結合することができるDNAまたはRNA配列を意味する。これは、前記インターロイキン12受容体2 mRNAの翻訳、細胞質内の電位 (translocation)、成熟 (maturation) または他のすべての全体的な生物学的機能に必須な活性を阻害することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの長さは6~100塩基、好ましくは8~60塩基、より好ましくは10~40塩基であってもよい。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、通常の方法で試験管内で合成され、生体内に投与するか、生体内でアンチセンスオリゴヌクレオチドが合成されるようにすることができる。試験管内でアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成する1つの例は、RNAポリメラーゼIを利用することである。生体内でアンチセンスRNAが合成されるようにする一つの例は、マルチクロニング部位 (MCS) の起源が反対方向にあるベクターを使用してアンチセンスRNAが転写されるようにすることである。前記アンチセンスRNAは、配列内に翻訳終止コドンが存在するようにしてペプチド配列に翻訳されないようにすることが望ましい。

【0061】

本発明で用いることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計は、インターロイキン12受容体2 (interleukin 12 receptor 2) の塩基配列を参照して、当業界に公知された方法に基づいて容易に製作することができる。

【0062】

本発明における用語、「siRNA」は、RNA干渉または遺伝子サイレンシング (silencing) を媒介することができる核酸分子であって、標的遺伝子の発現を抑制することができるため、効率的な遺伝子ノックダウン (knockdown) 方法または遺伝子治療の方法として使用される。前記siRNAは、二本鎖のRNAがダイサーによって切断されて生成された21~25ヌクレオチドの大きさの小さなRNA断片であり、相補的な配列を有するmRNAに特異的に結合して発現を抑制することができる。本発明の目的上、インターロイキン12受容体2 (interleukin 12 receptor 2) に特異的に作用して、インターロイキン12受容体2 (interleukin 12 receptor 2) 分子を切断してRNA干渉 (RNAi、RNA interference) 現象を誘導することにより、前記インターロイキン12受容体2 (interleukin 12 receptor 2) を抑制することができる。siRNAは、化学的にまたは酵素的に合成することができる。siRNAの製造方法としては、特に限定されず、当業界に公知された方法を使用してもよい。例えば、siRNAを直接化学的に合成する方法、試験管内 (in vitro) 転写を用いたsiRNAの合成法、試験管内 (in vitro) 転写によって合成された長い二本鎖RNAを酵素を用いて切断する方法、shRNA発

10

20

30

40

50

現プラスミドやウイルスベクターの細胞内伝達を通じた発現法及びPCR (polymerase chain reaction) 誘導 siRNA 発現カセット (cassette) の細胞内伝達を通じた発現法などがあるが、これに限定されるものではない。

【0063】

本発明の具体的な実施例では、GEダーマコン (GE Dharmacon) で製造したヒトインターロイキン12受容体2を特異的に抑制するカタログ#M_007932-00とラットインターロイキン12受容体2を特異的に抑制するカタログ#M_095069-01を使用して効果を確認した。

【0064】

本発明における用語、「治療」は、治療しようとする一人一人または細胞の天然の過程を変更させるために、臨床的に介入することを指し、これは、臨床病理状態の進行中またはこれを予防するために実行することができる。目的とする治療効果には、疾患の発生または再発を予防して、症状を緩和させ、病気に伴うすべての直接または間接的な病理学的結果を低下させ、転移を予防し、疾患の進行速度を減少させ、疾患状態を軽減または一時的緩和させて、回復させたり予後を改善させることが含まれる。好ましくは、本発明ではインターロイキン12受容体2を抑制する物質を含む組成物の投与により、血管疾患、特に血管肥厚症、心筋梗塞または不安定狭心症の経過を好転させる全ての行為を含む。また、「予防」は、本発明に係るインターロイキン12受容体2を抑制する物質を含む組成物の投与により、前記血管疾患、特に血管肥厚症、心筋梗塞または不安定狭心症の発症を抑制または遅延させる全ての行為をいう。

【0065】

本発明の薬学的組成物は、薬学的組成物の製造に通常的に使用される適切な担体、賦形剤または希釈剤をさらに含むことができる。薬学的に許容可能な担体を含む組成物は、経口または非経口の様々な剤形であってもよい。製剤化する場合には、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩解剤、界面活性剤などの希釈剤または賦形剤を使用して調製してもよい。経口投与のための固形製剤には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤などが含まれてもよく、これらの固形製剤は、一つまたは複数の化合物に少なくとも一つ以上の賦形剤、例えば、澱粉、炭酸カルシウム、スクロース (sucrose) またはラクトース (lactose)、ゼラチンなどを混ぜて調剤してもよい。また、単純な賦形剤以外にステアリン酸マグネシウム、タルクなどの潤滑剤も使用されてもよい。経口投与のための液状製剤としては、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤などが該当し、よく使われる単純希釈剤である水、リキッドパラフィン以外に様々な賦形剤、例えば湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが含まれてもよい。非経口投与のための製剤には、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、坐剤が含まれてもよい。非水性溶剤、懸濁溶剤には、プロピレングリコール (propylene glycol)、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物油、オレイン酸エチルのような注射可能なエステルなどが使用されてもよい。坐剤の基剤には、ウイテプゾール (witepsol)、マクロゴール、ツイン (tween) 61、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチンなどが使用されてもよい。

【0066】

また、本発明の薬学的組成物は、これに限定されないが、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤及び坐剤からなる群から選択されるいずれか一つの剤形を有してもよい。

【0067】

もう一つの形態として、本発明はインターロイキン12受容体2阻害剤を有効成分として含む薬学的組成物を個体に投与する段階を含む、血管疾患の治療方法を提供する。

【0068】

本発明における用語、「個体」は、本発明の血管疾患、特に血管肥厚症、心筋梗塞または不安定狭心症を保有するか、または発症した人間を含むすべての動物を意味する。本発明の薬学的組成物を個体に投与することにより、血管疾患、特に血管肥厚症、心筋梗塞ま

10

20

30

40

50

たは不安定狭心症を緩和または治療することができる。前記緩和は、本発明に係る組成物の投与で血管疾患、特に血管肥厚症、心筋梗塞または不安定狭心症が好転したり、有利になるすべての行為をいう。

【0069】

前記本発明の薬学的組成物は、薬学的に有効な量で投与する。

【0070】

本発明における用語、「投与」は、任意の適切な方法で対象に本発明の薬学的組成物を導入することをいい、投与経路は目的組織に到達することができる限り、経口または非経口の多様な経路を介して投与してもよい。

【0071】

前記薬学的組成物は、目的や必要に応じて、当業界で使用される通常の方法、投与経路、投与量に応じて適宜個体に投与することができる。投与経路の例としては、経口、非経口、皮下、腹腔内、肺内、局所内及び鼻腔内に投与されてもよく、非経口注入には、局所内（ステント利用）、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内または皮下投与が含まれる。また、当業界に公知された方法に応じて適切な投与量及び投与回数が選択されることができ、実際に投与される本発明の薬学的組成物の量及び投与回数は、治療しようとする症状の種類、投与経路、性別、健康状態、食餌、個体の年齢及び体重、及び疾患の重症度のような様々な因子によって適切に決定してもよい。

【0072】

本発明での用語、「薬学的に有効な量」は、医学的用途に適用可能な合理的な恩恵/リスク比で、血管透過性の増加を抑制または緩和するのに十分な量を意味し、有効容量レベルは、個体の種類及び重症度、年齢、性別、薬物の活性、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路、及び排出速度、治療期間、同時に使用される薬物を含む要素及びその他の医学分野でよく知られている要素に応じて決定されてもよい。本発明の組成物は、個々の治療剤として投与したり、他の治療剤と併用して投与してもよく、従来の治療法とは順次的または同時に投与してもよい。そして、単一または多重投与されてもよい。前記要素のすべて考慮して副作用のない最小限の量で最大の効果を得ることができる量を投与することが重要であり、当業者によって容易に決定されてもよい。

【0073】

もう一つの形態として、本発明は血管疾患の治療用の候補物質をインターロイキン12受容体2を発現する平滑筋細胞に処理する段階；及び前記インターロイキン12受容体2の発現レベルを測定する段階を含む、血管疾患治療剤のスクリーニング方法を提供する。

【0074】

具体的には、本発明のスクリーニング方法は、血管疾患治療用の候補物質処理により、インターロイキン12受容体2の発現レベルが低下する場合、血管疾患治療剤として判断されるものであってもよい。

【0075】

前記の「候補物質（test agent）」は、任意の物質（substance）、分子（molecule）、元素（element）、化合物（compound）、エンティティ（entity）またはこれらの組み合わせを含む。例えば、これらに限定されるわけではないが、タンパク質、ポリペプチド、小有機分子（small organic molecule）、多糖類（polysaccharide）、ポリヌクレオチドなどを含む。また、天然産物（natural product）、合成化合物または化学化合物または2つ以上の物質の組み合わせであってもよい。それ以外の指示がない限り、製剤、物質及び化合物は互換的に（interchangeably）使用してもよい。

【0076】

本発明の方法でスクリーニングされたり、同定される候補物質は、ポリペプチド、ベータターン模倣物（betaturnmimetics）、多糖類、リン脂質、ホルモン、プロスタグランジン、ステロイド、芳香族化合物、ヘテロサイクリック化合物、ベンゾジアゼピン（benzodiazepines）、オリゴマーリックN-置換グリシン（oligomeric N-substituted glycine

10

20

30

40

50

s)、オリゴカルバメート(oligocarbamates)、糖類(saccharides)、脂肪酸、プリン、ピリミジン、またはこれらの誘導体、構造的類似体または組み合わせを含む。前記試験物質は、合成または天然化合物のライブラリーを含む広範囲で多様な出処から得ることができる。

【実施例】

【0077】

以下、本発明を実施例を通じてより詳細に説明する。しかし、これらの実施例は、本発明を例示的に説明するためのもので、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものではない。

【0078】

実施例1：風船形成術により誘導された血管損傷マウスモデルの製作

本発明において、動物実験は梨花女子大学の動物管理及び使用委員会機関(Institutional Animal Care and Use Committee、IACUC)のガイドラインに準拠して、アメリカ国立衛生研究所が出版した「実験動物の管理及び使用のためのガイド(The National Academies Press、8th Edition、2011)」に基づいて実施した。

【0079】

本発明では、風船形成術により誘導された頸動脈損傷モデルには、10週齢のオスブラーグドローリー(Sprague-Dawley)ラットを使用し、ラットは既存に記載されているように(非特許文献4)頸動脈損傷モデルを製造し、まずイソフルランガス($N_2O : O_2 / 70\% : 30\%$)の吸入により麻酔させた。

【0080】

プロテオミクス分析のために、手術後にラットは異なる時点(18時間、3日、5日及び7日)までに、ケージ中で回復した。各実験群は、8匹のラットを使用し、シャム(sham)実験群を0時間対照群として使用した。

【0081】

組織学的及び免疫学的分析のために、ラットは10日間回復した。各実験群の大きさは、図面の説明に記載した通りであり、すべての動物実験は3回繰り返して実施した。

【0082】

実施例2：カテーテル媒介血管壁内の伝達方法による頸動脈へのsiRNA伝達

前記実施例1で製造した頸動脈損傷動物モデルの損傷された頸動脈組織にsiRNAを伝達して分子生物学的な変化を確認するために、カテーテル媒介血管壁内のsiRNA伝達の実験を行った。

【0083】

具体的には、ラット-特異的siRNA SMARTプール(GE Healthcare Dharmacon、カタログ#M_095069-01、200nM)を製造元(Ambion)の指示に従ってsiPORTTM NeoFXTM試薬と、まず混合した。風船形成術による損傷直後に、総頸動脈(common carotid arteries)をOpti-MEMで洗浄し、カテーテルを介して前記予め混合しておいた形質転換試薬を投与した。形質転換効率を高めるために15分間静置した後、決着させた。血管壁内のsiRNA伝達を確認するために蛍光染料-結合対照群siRNAであるsiGLO-Red(Dharmacon)を使用した。

【0084】

実施例3：組織学的分析

組織学的分析のために、前記実施例1で開示されたように、ラットはイソフルランガス($N_2O : O_2 / 70\% : 30\%$)を用いて麻酔させ、3.7%ホルムアルデヒドを含むヘパリン生理食塩水で経心臓灌流固定(transcardiac perfusion-fixation)をした後、頸動脈を切除した。切除した頸動脈の血管は、パラフィン包埋(paraffin embedded)して、回転式ミクロトーム(Leica RM2255)を用いて切断した。総頸動脈の中の部位から2つの連続した組織切片(4um厚)を得て、ヘマトキシリン&エオシン(H&E)で染色した。内腔(luminal)、内部弾力層(internal elastic laminal)及び外部弾力層(external elastic laminal)の面積は、NIH image v1.62を用いて測定した。

10

20

30

40

50

内膜と内層面積は、内部弾力層の面積から内腔面積と外部弾力層の面積を除外することにより測定した。各ラットごとに二連の組織切片から測定された値の平均値を分析に使用した。

【 0 0 8 5 】

実施例 4：ヒト血液標本の分析

本発明で使用される血液標本は、正常-健康対照群と血管造影術を介して冠動脈疾患と診断された患者群から採取した。これは梨花女子大学医療院（ソウル、韓国）の臨床試験審査委員会の承認を得て行った。

【 0 0 8 6 】

前記冠動脈疾患の患者のうち、虚血を有する患者は、臨床基準に基づいて安全狭心症（stable angina）、不安定狭心症（unstable angina）及び急性心筋梗塞（acute myocardial infarction）に分類した。本実験に参加したすべての応募者は、彼らの情報提供に対して同意した後に参加した。

【 0 0 8 7 】

前記得られた全血液（whole blood）サンプルは遠心分離し、血漿サンプルは Pierce albumin/IgG 除去 kit を製造社の指示に従って使用して、さらに分離した。

【 0 0 8 8 】

実施例 5：統計分析

統計学的有意性（P value）を確認するためには、Student's t-test を用いた二集団間の比較または多数集団に対する Tukey's 「正直有意差」（「honestly significant difference」）post hoc テスト（Windows 版 SPSS12.0K、SPSS、シカゴ、IL、USA）を用いた一元配置分散分析（one-way ANOVA）を用いて、結果を分析した。P 値が 0.05 以下の場合（ $P < 0.05$ ）は、統計学的に有意であると見た。血液標本を用いたデータは、クラスカル・ウォリス順位和検定（Kruskal-Wallis rank sum test）とウィルコクソン順位和検定（Wilcoxon rank sum test）の二つのノンパラメトリック検定（non-parametric test）を介して分析した。

【 0 0 8 9 】

実験例 1：ラット頸動脈の物理的な損傷によるプロテオーム変化の分析

風船形成術によって誘導されたラット頸動脈損傷は、血栓症によって誘導された平滑筋（SMC、smooth muscle cell）肥大症と典型的な新生内膜（neointimal）肥厚症を誘導する内皮剥離の症状を現す。これにより、前記風船形成術によって誘導されたラット頸動脈損傷は、風船型塞栓除去用カテーテルを用いて動脈血管に物理的な損傷を与えた場合と同様の症状を現す。本生体内モデルは、SMC 肥大症と関連した組織学的及び生化学的研究に使用することができる。

【 0 0 9 0 】

まず、風船形成術によって損傷した頸動脈から新生内膜肥厚症の動態を確認した。既知のように、風船形成術による損傷は損傷部位の内腔側面（lumen）において、胃内膜の厚さの徐々の増加を誘導する（図 1）。これらの動態に基づいて、5つの順次的な時点を選択して（シャム対照群、損傷後 18 時間、3 日、5 日及び 7 日）、2D-差動電気泳動（2-dimensional differential gel electrophoresis、2D-DIGE）によりプロテオミクス分析を行った（図 2 a）。

【 0 0 9 1 】

DIGE 分析に必要な十分な量のタンパク質を得るために、各時点毎に得られた 8 つの損傷した頸動脈組織からタンパク質を抽出し、超遠心細胞分画法（subcellular fractionation）を用いて分離した（図 2 b）。このように分けられたタンパク質画分は、Cy3 / Cy5 蛍光染色した後 2D-差動電気泳動により分離され、総 2,100 以上のタンパク質スポットに対する発現分析を行った。内部標準（Cy2-labeled）に対して、各損傷実験サンプルのタンパク質発現をプラッキングした結果、140 個のタンパク質スポットが時間依存的に発現変化を起こすことを確認した。前記 140 個のタンパク質スポットのう

10

20

30

40

50

ち、質量分析計を用いて分析可能な44個のタンパク質を成功的に同定した。同定されたタンパク質の差動的発現は、それぞれに特異的な抗体（IL-12R₂ 特異的な抗体；サンタクルーズバイオテック、クローンE-20、カタログ#sc-18648/Atlas抗体社、製品#HPA024168）を利用した免疫プロットで確認し、これにより、前記プロテオーム分析を定量的かつ正確に行われたことを確認した（図2c）。

【0092】

実験例2：インターロイキン12受容体₂の試験管内（in vitro）及び動物（in vivo）での機能確認

前記実験例1で同定された44個のタンパク質のうち、インターロイキン12受容体₂の変化に注目して、ヒト大動脈平滑筋細胞（Human Aortic SMCs、HASMCs）での細胞機能の有効性検査を実施した。

10

【0093】

具体的には、ヒト大動脈平滑筋細胞に、前記IL-12R₂（interleukin 12 receptor₂）に特異的なsiRNA（small-interference RNAs）4種（GE Healthcare Dharmacon、Cat #M_007932-00）を混合処理して、ノックダウンした。血小板由来成長因子（PDGF）とTNF- α は、風船形成術による損傷患部の血小板/大食細胞によって生成される重要な因子であるため、大動脈平滑筋細胞の増殖と走化性移動はPDGF-BBが誘導し、平滑筋細胞に対する単核球の付着は腫瘍壊死因子（TNF- α ）が誘導する。

【0094】

結果としてインターロイキン12受容体₂のノックダウンは、前記3つの細胞活性をすべて著しく減少させた（図4）。

20

【0095】

また、実施例2に述べたようにカテーテルを介してラットに特異的なIL-12R₂（Interleukin 12 receptor₂）siRNAを伝達して、風船形成術によって損傷した頸動脈を形質転換した時、IL-12R₂のノックダウンが成功的に確立され（図5のA）、対照群siRNAに比べて新生内膜肥厚症が顕著に減少した（図5のB）。これはIL-12R₂が血管平滑筋細胞で発現され、平滑筋肥大症に重要な機能を果たすということを実証する。

【0096】

実験例3：血管肥厚症に対する潜在的バイオマーカーであるIL-12R₂
急速に成長したり、損傷した細胞は、細胞タンパク質またはmicroRNAをエキソソーム（exosomes）の形で放出するため、本発明者らは、前記検証されたIL-12R₂タンパク質が冠動脈疾患を有する患者、特に急性心筋梗塞または不安定狭心症のような不安定な症状を有する患者の血液において高発現を現すことを確認した。

30

【0097】

そのためには細胞株で内生的に発現されたIL-12R₂タンパク質を特異的に認識する抗体（サンタクルーズバイオテック、クローンE-20、カタログ#sc-18648；Atlas抗体社、製品#HPA024168）を使用した（図6a）。微量のタンパク質検出を改善するために、アルブミンと免疫グロブリンを含む豊富な血漿タンパク質を患者の血漿サンプルから除去した（図6b）。

40

【0098】

前記狭心症の症状を伴う冠状動脈造影術を施行した患者から得られた血漿サンプルのウェスタンブロット分析を行い、正常人のサンプルと比較した。その結果、正常人のサンプルに比べて、患者のサンプルからIL-12R₂タンパク質が著しく高いレベルで発現されることが確認された（図7）。

【0099】

図8aで確認できるように、定量及び統計分析を介して血漿からのIL-12R₂発現レベルがヒト患者の疾患重症度と密接な関係があることを確認した（4集団間の $P = 3.448 \times 10^{-6}$ ）。

【0100】

50

また、血漿 I L - 1 2 R 2 が、血管が狭くなる症状と関連があることを確認するために、病理学的内膜肥厚症を伴うヒト患者 (n = 3) の頸動脈血管で組織染色を介して I L - 1 2 R 2 の発現を測定した。その結果、 I L - 1 2 R 2 が正常動脈血管の壁よりも肥厚した内膜病変で顕著に高く発現することを確認した (図 8 b) 。

【 0 1 0 1 】

血漿で発見された I L - 1 2 R 2 タンパク質の分子量は、全長形態の分子量に対応するため、タンパク質加水分解によって分散されず、エキソソーム形で放出されると考えた。これを確認するために、本発明者らは、血漿サンプルを超遠心分離及びポリマーベース沈殿 (polymer-based precipitation) を用いて細胞外小包を分離した。実際に、 I L - 1 2 R 2 はエキソソームマーカーである C D 9 及び C D 8 1 と共に沈殿物に存在した (図 9 a 及び図 9 b) 。前記エキソソームマーカーと関連して、 C D 6 3 に特異的に結合する抗体としてはシステムバイオサイエンス社、カタログ # E X O A B - C D 6 3 A - 1 、 C D 9 に特異的に結合する抗体としてはシステムバイオサイエンス社、カタログ # E X O A B - C D 9 A - 1 、 C D 8 1 に特異的に結合する抗体ではシステムバイオサイエンス社、カタログ # E X O A B - C D 8 1 A - 1 を使用した。また、平滑筋マーカーである P D G F R もエキソソーム画分から検出され、これは患者の血清サンプルに平滑筋細胞由来エキソソームが存在することを示す。

10

【 0 1 0 2 】

最後に、 I L - 1 2 R 2 と P D G F R が同じエキソソームに存在するかどうかを確認するために、患者の血清から P D G F R を P D G F R に特異的に結合する抗体 (サンタクルーズバイオテック社、クローン P - 2 0 、カタログ # s c - 3 3 9) を用いて免疫沈殿 (immunoprecipitation) し、ここから I L - 1 2 R 2 を検出した結果、図 9 c で確認したように P D G F R 免疫沈殿物から I L - 1 2 R 2 が検出されることを確認した。すなわち、前記二つのタンパク質がエキソソームに共同在し、当該エキソソームは平滑筋細胞由来であることを確認した。

20

【 0 1 0 3 】

前記のような結果を総合すると、肥厚していく大動脈血管から I L - 1 2 R 2 の発現が誘導され、これは血斑 (plaque) 不安定性により患者の血液中に放出されることを確認した。したがって、本発明では、血管疾患における疾患の重症度を測定するマーカーとして I L - 1 2 R 2 を使用することができることを確認した。

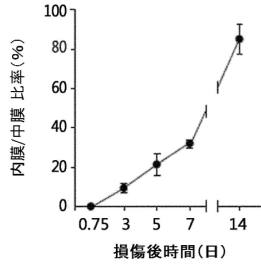
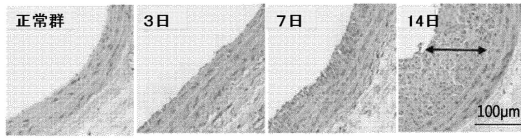
30

【 0 1 0 4 】

以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者は本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更せず、他の具体的な形で実施されることが理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例は、すべての面で例示的なものであり、限定的なものではないものとして理解するべきである。本発明の範囲は、前記の詳細な説明ではなく、後述する特許請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導出されるすべての変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈されるべきである。

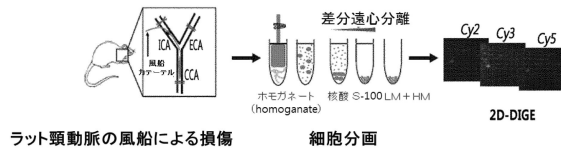
【図 1】

【図 1】



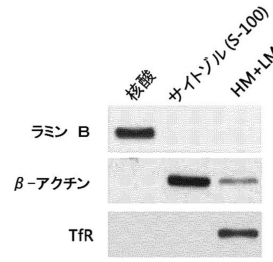
【図 2 a】

【図 2 a】



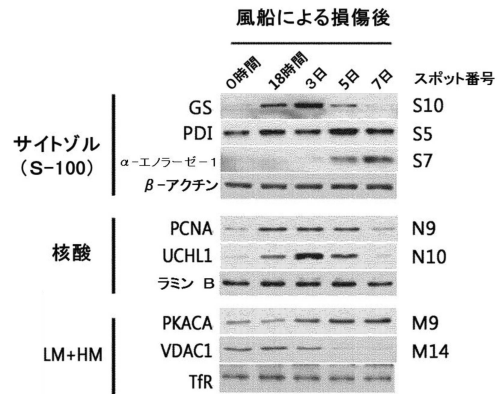
【図 2 b】

【図 2 b】



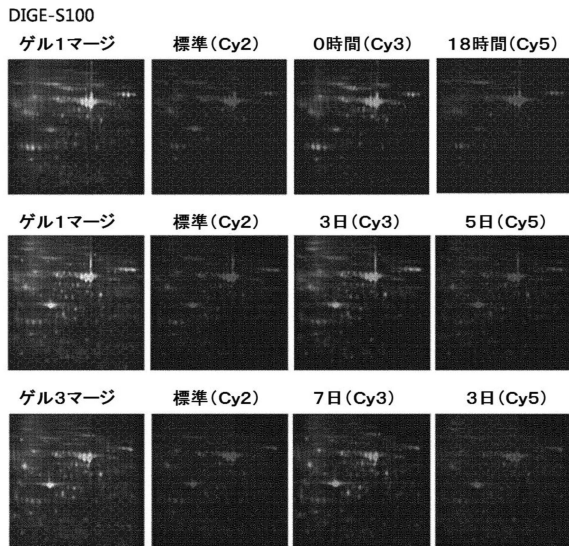
【図 2 c】

【図 2 c】



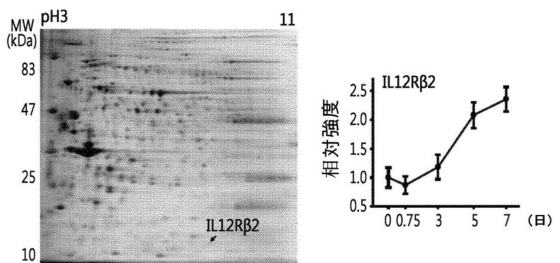
【図 3 a】

【図 3 a】



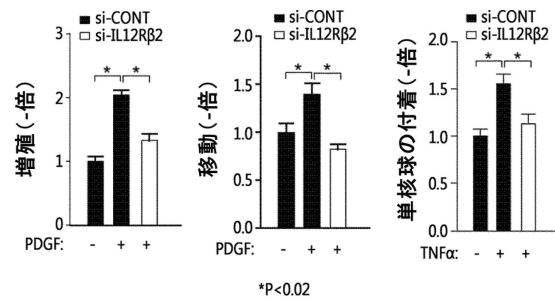
【図 3 b】

【図 3 b】



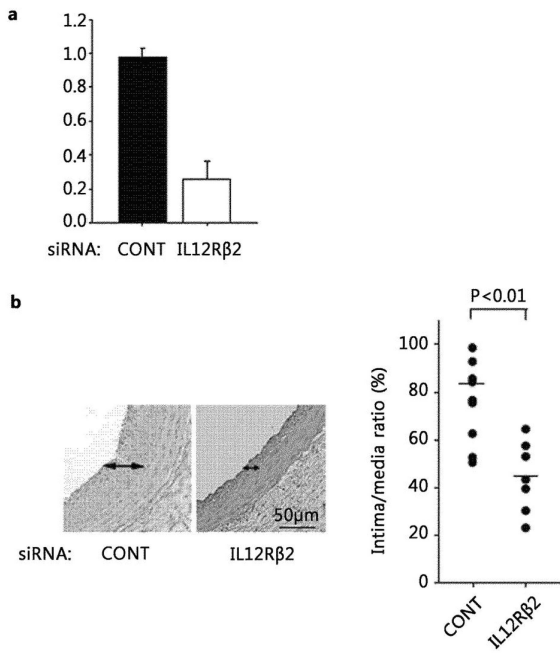
【図 4】

【図 4】



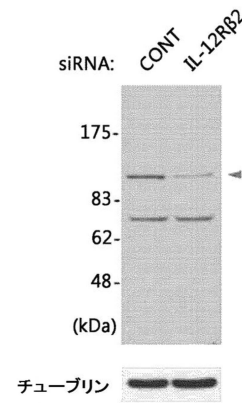
【 図 5 】

【 図 5 】



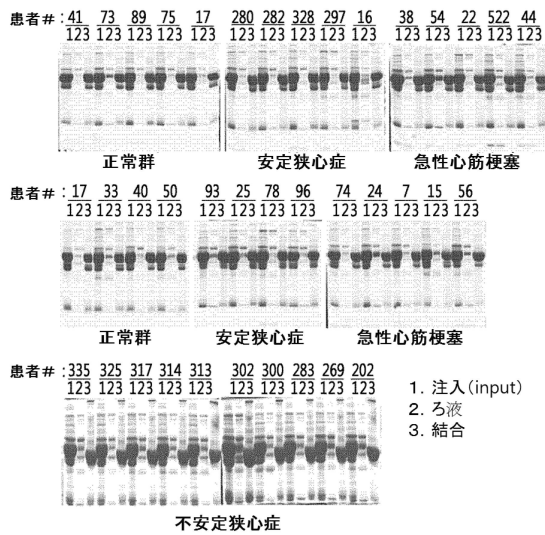
【 図 6 a 】

【 図 6 a 】



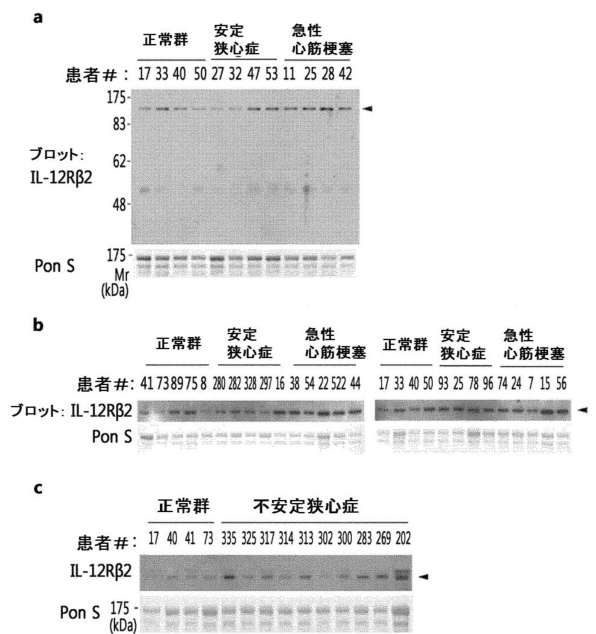
【 図 6 b 】

【 図 6 b 】



【 図 7 】

【 図 7 】



【配列表】

0006535385000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/713 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088	
C 0 7 K 16/24 (2006.01)		A 6 1 K 31/713	
		A 6 1 K 31/7105	
		G 0 1 N 33/53	D
		C 0 7 K 16/24	

審査官 大瀧 真理

- (56) 参考文献 特表 2 0 1 4 - 5 1 0 7 0 7 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 3 / 1 3 4 7 8 6 (W O , A 2)
 Mari Levula et al. , Genes Involved in Systemic and Arterial Bed Dependent Atherosclerosis - Tampere Vascular Study , PLoS ONE , 2 0 1 2 年 , Vol.7, Issue 4, e33787 , pp.1-10
 Joana M. Xavier et al. , Association Study of IL10 and IL23R.IL12RB2 in Iranian Patients With Behcet's Disease , ARTHRITIS & RHEUMATISM , 2 0 1 2 年 , Vol.64, No.8 , pp.2761-2772

(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)

专利名称(译)	用于诊断血管疾病的生物标志物及其用途		
公开(公告)号	JP6535385B2	公开(公告)日	2019-06-26
申请号	JP2017542865	申请日	2016-02-05
[标]发明人	カンサンウォン カンドンフン		
发明人	カン サンウォン カン ドンフン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 C12Q1/04 A61P9/10 A61K45/00 A61P9/00 A61K39/395 A61K31/7088 A61K31/713 A61K31/7105 C07K16/24		
CPC分类号	A61K45/00 G01N33/53 G01N33/6869 G01N33/6896 G01N2333/7155 G01N2800/32 A61P9/00 A61P9/10 G01N2333/5434 G01N2500/10 C12Q1/6886 C12Q2525/205 C07K16/2866 G01N33/5023 G01N33/5061 G01N33/6842 G01N2570/00		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.P G01N37/00.102 C12Q1/04 A61P9/10.101 A61P9/10 A61K45/00 A61P9/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K31/7088 A61K31/713 A61K31/7105 G01N33/53.D C07K16/24		
优先权	1020150020481 2015-02-10 KR		
其他公开文献	JP2018513353A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断血管疾病的组合物和用于诊断血管疾病的试剂盒，其包含用于测量血液中白细胞介素12受体β2蛋白水平的制剂。本发明还涉及提供血管疾病诊断信息的方法，包括测量怀疑患有血管疾病的个体的分离血液样品中白细胞介素12受体β2蛋白水平的步骤。此外，本发明提供用于预防或治疗血管疾病的组合物和用于治疗血管疾病的候选物质，其包含白细胞介素12受体β2活性的抑制剂，用于治疗平滑肌细胞以获得白细胞介素12。本发明涉及筛选血管疾病治疗剂的方法，该方法包括测量受体β2的表达水平的步骤。根据本发明，通过使用白细胞介素12受体β2作为血管疾病，特别是心肌梗塞或不稳定型心绞痛的生物标志物，血管疾病只能通过现有的血管造影术来诊断。另一方面，使用血液的非侵入性和经济上快速的诊断是可能的。因此，通过疾病加重后出现缺血症状后的主观症状诊断出的血管疾病领域的早期诊断，可以实现传统上不可能的早期和预防性治疗。它变得可能。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6535385号 (P6535385)
(45) 発行日 令和1年6月26日(2019.6.26)		(24) 登録日 令和1年6月7日(2019.6.7)
(51) Int.Cl.	F I	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 ZNAP	
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 37/00 I02	
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	
A61P 9/10 (2006.01)	A61P 9/10 I01	
A61K 45/00 (2006.01)	A61P 9/10	
請求項の数 17 (全 23 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2017-542865 (P2017-542865)	(73) 特許権者 517280937	
(86) (22) 出願日 平成28年2月5日(2016.2.5)	ウォンメディカル コーポレーション	
(65) 公表番号 特表2018-513353 (P2018-513353A)	大韓民国 14542 キョンギードブ	
(43) 公表日 平成30年5月24日(2018.5.24)	チョンシ ソンネーザロ 265ボン	
(88) 国際出願番号 PCT/KR2016/001301	ギル 67 704ホ	
(87) 国際公開番号 W02016/129890	11000796	
(87) 国際公開日 平成28年8月18日(2016.8.18)	特許業務法人三枝国際特許事務所	
審査請求日 平成29年8月23日(2017.8.23)	(74) 代理人	
(31) 優先権主張番号 10-2015-0020481	大韓民国 06517 ソウル ソチョー	
(32) 優先日 平成27年2月10日(2015.2.10)	グ ジェムウォンロー 166-17 4	
(33) 優先権主張国 韓国 (KR)	- 1101	
	カンドンフン	
	大韓民国 13361 キョンギードソ	
	ンナムシ チェンウォング クワンミ	
	ョンロー 114 1102ホ	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 血管疾患診断用バイオマーカー及びその用途		