

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-53222

(P2011-53222A)

(43) 公開日 平成23年3月17日(2011.3.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 有 請求項の数 9 O L 外国語出願 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2010-244271 (P2010-244271)	(71) 出願人	504310135
(22) 出願日	平成22年10月29日 (2010.10.29)		ゾルク, クレメンス
(62) 分割の表示	特願2003-568411 (P2003-568411) の分割		ドイツ連邦共和国, 4 8 1 6 1 ミュンスター, アルハルドシュトラーセ 2 1
原出願日	平成15年2月17日 (2003.2.17)	(71) 出願人	504310146
(31) 優先権主張番号	10/077,600		ロート, ヨハネス
(32) 優先日	平成14年2月15日 (2002.2.15)		ドイツ連邦共和国, 4 8 1 5 3 ミュンスター, アウグスタシュトラーセ 2 9
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100099759
			弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カルグラヌリンCを用いた炎症性疾患の診断方法

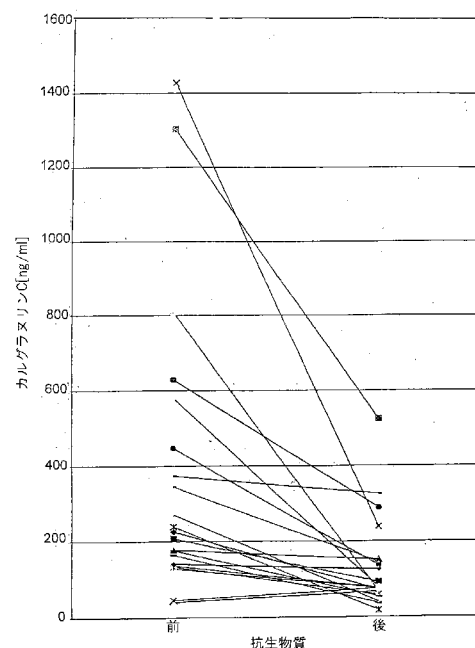
(57) 【要約】

【課題】炎症疾患、特に慢性炎症性腸疾患をモニターする方法の提供。

【解決手段】カルグラヌリンCマーカーの量及び/又は濃度の測定による。より具体的に、(a)患者から得た生物学的サンプル中のカルグラヌリンCのポリペプチドの量及び/又は濃度を測定し；(b)患者の対照サンプル中で測定されたカルグラヌリンCポリペプチドの量及び/又は濃度を、生物学的サンプル中のカルグラヌリンCポリペプチドの量及び/又は濃度を比較することを含むことによる。

【選択図】 図 1

図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

炎症性疾患の診断方法であって、以下のステップ：

- a) 診断される哺乳動物の体液又は組織の生物学的サンプルを取得し；
- b) 上記生物学的サンプル中に存在するカルグラヌリンCのポリペプチド及び／又は上記ポリペプチドをコードする核酸の量及び／又は濃度を測定し；そして
- c) 上記生物学的サンプル中のカルグラヌリンCポリペプチドの測定量及び／又は濃度を、コントロールのサンプル中の測定されたカルグラヌリンCポリペプチドの量及び／又は濃度と比較し、及び／又は
上記生物学的サンプル中のカルグラヌリンCポリペプチドをコードする核酸の測定量及び／又は濃度を、対照のサンプル中の計測されたカルグラヌリンCポリペプチドをコードする核酸の量及び濃度と比較することを含み、
ここで、カルグラヌリンCポリペプチド及び／又は上記ポリペプチドをコードする核酸の量の上記差が、診断される疾患の段階を指標する、前記方法。

10

【請求項 2】

核酸プローブが、前記ポリペプチドをコードするカルグラヌリンCの核酸の量及び／又は濃度を測定するために使われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記核酸プローブが、配列番号1に示す核酸配列に由来する、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記核酸プローブが、配列番号1に示す核酸配列、及び／又はその断片にハイブリダイズする核酸を含む、請求項2に記載の方法。

20

【請求項 5】

PCRに基づく技術が使用される、請求項2に記載の方法。

【請求項 6】

特異抗体を、カルグラヌリンCポリペプチドの量及び／又は濃度を測定するために使用する、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記特異抗体が、配列番号2示すアミノ酸配列に由来するエピトープを認識する、請求項6に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記抗体が、ポリクローナル抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体断片、一本鎖抗体、及び二重特異性抗体を含む群から選ばれる、請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体を、免疫アッセイ、例えばELISA又は免疫組織化学的技術を行うために使用する、請求項6に記載の方法。

【請求項 10】

カルグラヌリンCポリペプチド及び／又は上記ポリペプチドをコードする核酸の量及び／又は濃度を測定することが、カルグラヌリンCのポリペプチド及び／又は上記ポリペプチドをコードする核酸の量及び／又は濃度を局所的マーカーとして測定することを含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記炎症性疾患が、脈管炎、特に川崎病である、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

前記炎症性疾患が、嚢胞性線維症である、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

前記炎症性疾患が、慢性炎症性腸疾患様の、例えば潰瘍性大腸炎又はクローン病である、請求項1に記載の方法。

【請求項 14】

前記炎症性疾患が、慢性気管支炎である、請求項1に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記炎症性疾患が、炎症性関節炎様の、例えば乾癬性関節炎、リウマチ性関節炎、又は血清陰性関節炎である、請求項1に記載の方法。

【請求項 16】

前記炎症性疾患が、全身発症若年性リウマチ性関節炎(SOJRA、スティル病)である、請求項1に記載の方法。

【請求項 17】

前記炎症性疾患が、慢性炎症の背景上の急性炎症である、請求項1に記載の方法。

【請求項 18】

前記炎症性疾患が、慢性炎症性疾患の背景上の後天性感染である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記炎症性疾患が、既往の疾患の悪化である、請求項1に記載の方法。

【請求項 20】

炎症性疾患の特定の段階を診断するため、及び/又は、再発の危険性を決定するため、及び/又は疾患と似たような症状との間を区別するための、請求項1に記載の方法の使用。

【請求項 21】

前記診断が、炎症性疾患の予防及び/又はモニターの基礎として役に立つ、請求項1に記載の方法の使用。

20

【請求項 22】

治療を必要とする哺乳動物における炎症性疾患の治療方法であって、以下のステップ：

a) 請求項1に記載のステップa)～c)を行い；そして

b) 上記治療を必要とする哺乳動物を、治療される疾患の段階に基づき医学的に処置することを含む、前記方法。

【請求項 23】

前記炎症性疾患が、局所的炎症性疾患である、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

前記炎症性疾患が、脈管炎、特に川崎病である、請求項22に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記炎症性疾患が、嚢胞性線維症である、請求項22に記載の方法。

【請求項 26】

前記炎症性疾患が、慢性炎症性腸疾患様の、例えば潰瘍性大腸炎又はクローン病である、請求項22に記載の方法。

【請求項 27】

前記炎症性疾患が、慢性気管支炎である、請求項22に記載の方法。

【請求項 28】

前記炎症性疾患が、炎症性関節炎様の、例えば乾癬性関節炎、リウマチ性関節炎、又は血清陰性関節炎である請求項22に記載の方法。

40

【請求項 29】

前記炎症性疾患が、全身発症若年性リウマチ性関節炎(SOJRA)である、請求項22に記載の方法。

【請求項 30】

前記炎症性疾患が、慢性炎症の背景上の急性炎症である、請求項22に記載の方法。

【請求項 31】

前記炎症性疾患が、慢性炎症性疾患の背景上の後天性感染である、請求項22に記載の方法。

【請求項 32】

前記炎症性疾患は、既往症の悪化である、請求項22に記載の方法。

50

【請求項 33】

予防の必要のある哺乳動物における炎症疾患の予防方法であって、以下のステップ：

a) 請求項1に記載のa) から c) のステップを行うこと；及び

b) 治療を必要とする哺乳動物を、予防される疾患の段階に基づき医学的に処置するを含む前記方法。

【請求項 34】

前記炎症性疾患が、局所的炎症性疾患である、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

前記炎症性疾患が、脈管炎、特に川崎病である、請求項33に記載の方法。

【請求項 36】

前記炎症性疾患が、嚢胞性線維症である、請求項33に記載の方法。

【請求項 37】

前記炎症性疾患が、慢性炎症性腸疾患様の、例えば潰瘍性大腸炎又はクローン病である、請求項33に記載の方法。

【請求項 38】

前記炎症性疾患が、慢性気管支炎である、請求項33に記載の方法。

【請求項 39】

前記炎症性疾患が、炎症性関節炎の様の、例えば乾癬性関節炎、リウマチ性関節炎、又は血清陰性関節炎である請求項33に記載の方法。

【請求項 40】

前記炎症性疾患が、全身発症若年性リウマチ性関節炎(SOJRA)である、請求項33に記載の方法。

【請求項 41】

前記炎症性疾患が、慢性炎症の背景上の急性炎症である、請求項33に記載の方法。

【請求項 42】

前記炎症性疾患が、慢性炎症性疾患の背景上の後天性感染である、請求項33に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**発明の技術分野

本発明は、カルグラヌリンCマーカーに基づいた炎症性疾患の診断方法、特に炎症性疾患の特異的段階の診断方法、及び / 又は再発の危険性の決定方法、及び / 又は疾患と類似の症状との区別方法に関する。

【背景技術】**【0002】**発明の背景

多くの疾患は、炎症の症状によって特徴付けられる(炎症性疾患)。指標は、炎症の局所部位における炎症性細胞、例えば好中球及びマクロファージである。炎症部位は、全身でありうる。つまり炎症性細胞により分泌されるタンパク質が、血清において検出できるようになる。

【0003】

異なる又はしばしば未知の病原性の背景にも関わらず、炎症性疾患の初期の症状は、とてもよく似うる；例えば、熱は、急性炎症性疾患のよくある症状である。炎症性疾患の既知の原因は、自己免疫反応、細菌性、ウイルス性、又は寄生虫性感染、遺伝的障害、アレルギーである。例えば、上皮の炎症によって特徴付けられるよくある疾患である乾癬では、多くの場合これらの又は別の原因の混合が、提案されてきている。乾癬患者のある場合では、運動性のシステムが冒され、乾癬性関節炎をもたらす。特に、この疾患において関節は、強い炎症により冒され、ついには硬直をもたらす。この疾患は、複数の因子、例えば遺伝的素因、心因性ストレス、又は肌の刺激によっておそらく起こされることによ

10

20

30

40

50

り特徴付けられる。

【0004】

慢性炎症性関節炎の異なる形態は、異種群の治療上関連のある疾患であって、一般の間葉組織に影響を与える疾患を含む。これは、関節組織の重度の破壊を導き、軟骨及び骨の損傷をもたらし、そして患者において重度の能力障害に寄与する。滑膜組織の炎症は、リウマチ性関節炎における周辺関節疾患のよくある特徴である。滑膜の炎症、つまり滑膜炎は、ライニング(lining)層の肥厚並びにサブライニング(sublining)層の細胞の湿潤及び過度の血管増生によって特徴付けられる。Tリンパ球に加えて、食細胞は、炎症誘発性サイトカイン及びメタロプロテイナーゼを分泌することにより、滑膜炎の病原に重大な役割を担う(Bresnihan & Tak, 1999, Res Clin Rheumatol 13: 645-659)。急性悪化は、リウマチ性関節炎の特徴である。病因学は、たいてい不明であるが、自己免疫疾患の背景が提案される。

10

【0005】

子供では、若年性慢性関節炎(JCA)又は若年特発性関節炎(JIA)に関連して、若年性リウマチ性関節炎(JRA)は、最も頻繁なリウマチ性自己免疫疾患である。16歳までの子供が発症する。JRAの異なる形態の群の間では、全身発症若年性リウマチ性関節炎(SOJRA)又はスティル病は、最も重篤であり、危険な形態である。SOJRAは、いくつかの器官、例えば、脾臓、肝臓、リンパ節、骨髄、上皮を含む全身性炎症反応によって特徴付けられる。この疾患の更なる経過の間、患者は、抗炎症治療に対し難治性である重度の関節炎を発達させる。この疾患の病原は、完全に未知である。SOJRAを患う患者は、初回提示で特徴的な免疫学的特徴を示さないが、自然免疫系、例えば血小板増多症、好中球増加及び補体系の全体における活性化を示す。この非特異的炎症のパターンは、初期診断に関して、特に細菌感染からの区別に関して難しさ原因となる。SOJRAは、初期症状においては細菌感染と似ており、そして信頼できる診断マーカーが存在しないという事実は、正しい薬物療法を早い時期に選ぶことを難しくしている。

20

【0006】

抗炎症性物質の投与によって、JRAの異なる形態の治療の正確な制御は、今まで不十分で行われうる。異なる疾患形態の病原は、たいてい不明であり、それゆえ、治療は、特定標的に向けられなかった。特に、薬物療法における治療の終わりの点は、大きな問題を示す：約50%のJRA患者は、メトトレキセート(MTX)での治療の退薬の後、再発する。(Ravel li et al., 1995, J Rheumatol 22: 1574)。いくつかの著者は、それゆえ、JRA患者を、治療寛解のあとであっても免疫抑制剤で患者に数年間治療することを提案した。今日まで、再発の危険性を取り除くために、リウマチ性関節炎疾患の残存炎症活性を素早くかつ感度良く測定するための信頼できるパラメータが存在しない。よくある炎症のパラメーター、例えばC-反応性タンパク質(CRP)又は、赤血球沈降割合(ESR)は、特異性及び感受性を欠く(Giannini and Brewer, 1987, Clin Rheumatol 6:197)。疾患の活性を測定するための国際的に許容されるスコアは、治療上の判定基準に大部分頼っている(Giannini and Brewer, supra)。この疾患活性の不適切な調査は、免疫抑制剤で患者を定常的に治療することをもたらす、重度の副作用をもたらす(Giannini and Cassidy, 1993, Drug Saf 9: 325)。

30

40

【0007】

乾癬性関節炎は、通常リウマチ性関節炎程破壊的ではない。そのことは、滑膜マクロファージの浸潤が少ないこととそれに続く炎症誘発性のサイトカインの産出が低いことが原因である(Veale et al., 1993, Arthritis Rheum 36: 893-900; Danning et al., 2000, Arthritis rheum 43: 1244-1256)。それにもかかわらず、好中球は、乾癬性関節炎の滑膜炎において頻度高く存在しており、一般化された好中球移動の上昇及びリソソーム酵素の分泌の上昇は、乾癬性関節炎患者において報告された(Biasi et al., 1998, Inflammation 22:533-543; Mikulikova et al., 1984, Clin Rheumatol 3:515-519)。付け加えて、おそらく、内皮の活性化のためにおこる、血管成長及び機能の変質は、乾癬性関節炎における滑膜炎で初期の役割を担うようである(Reece et al., 1999, Arthritis Rheum 42: 1

50

481-1484; Fearon et al., 1999, Ann NY Acad Sci 878: 619-621)。Th1サイトカイン、モノカイン、及び血管内皮成長因子(VEGF)は、乾癬性関節炎の滑膜に存在しており、乾癬性肌損傷における血管新生を促進することを提案される(Fraser et al., 1991, Arthritis Rheum 44: 2024-2028; Lowe et al., 1995, Br J Dermatol 132: 497-505)。しかしながら、乾癬性関節炎におけるサイトカインの滑膜部位での発現は、あまり特徴づけられていない(Ritchlin et al., 1998, J Rheumatol 25: 1544-1552)。

【0008】

一方、川崎病は、熱及び複数の器官の発症を付随する急性疾患である。子供における最もよくある全身性の脈管炎である。1歳以下の子供及び少年は、冠動脈不全のため致命的な疾患となる特別な危険性を有する。しかしながら、証拠は、好中球及び内皮性細胞が冒される自己免疫疾患であると指すが、病因論はたいてい知られていない。脈管炎、特に川崎病は、優先的に小さいサイズ及び中程度のサイズの動脈を冒す、壊死性の過程である。脈管炎、特に川崎病の病因学及び病原は、不明のままである。この疾患は、おそらく超抗原のため、炎症反応を全身で刺激することによって最もよく特徴付けられうる。この疾患状態の診断のための信頼できるマーカーの同定及び心臓合併症の増大される危険性を有する患者の同定は、患者の適切な治療にとって有利であろう。

10

【0009】

嚢胞性線維症(CF)は、遺伝子変異によって引き起こされる病気であり、白人の間で、最もよくある遺伝性の致命的な病気であり、生きて誕生したものの内1:3400の推計の発生率を有する。嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)のミューテーションは、呼吸上皮においてCl⁻輸送の欠損をもたらして、粘液排除の減少をもたらす。結果は、粘液産物の増加、慢性気道炎症、再発性の感染、及び障害された宿主の防衛メカニズムとなる。慢性気道炎症は、罹患率及び死亡率の主な原因である。典型的な種のスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)及びシュードモナス・アエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)の異なる種を含む様々なグラム陽性及び陰性の細菌の肺への感染は、多くの合併症の理由となる。好中球性の炎症は、一生の早い時期に起こり、進行性組織変化に寄与する。急性悪化は、入院及び抗生物質治療のよくある理由である。高いレベルの慢性炎症のために、例えば後天性細菌感染による炎症の急性悪化を診断することはとても難しい。この重篤な疾患の適切な治療を保証するため、(たった80%の患者のみが19歳以上になる)、早い時期の診断が必要である。

20

30

【0010】

慢性炎症疾患、特にCFを患う患者における急性の悪化を診断する際に、主要な問題の一つが横たわる。CFにおける医師の主要な仕事の一つは、慢性炎症の急性の肺合併症に対する治療を調節することである。急性感染の悪化の同定は、治療経験に基づいており、客観的なパラメーターを用いるよりはむしろ主観的な印象に頼っている。急性発症を特定するための判断基準についての意見の一致は欠如している。急性の感染、例えば熱、白血球数増多症、CRP、ESR、肺機能の悪化、及び痰を同定するために通常使われる慣用のパラメーターは、いつも有用であるわけではない。別の形態で存在する急性呼吸感染と合わせて肺疾患が慢性であることは、CFを取り扱う医師にとって主要な問題を提示する。感染を指摘して、疾患をモニターし、そして治療を導くより信頼できるマーカーを持つことは、有用であるだろう。理想的な感受性のマーカーは、全身反応が起こる前に、局所的な気管支の過程を指摘する。

40

【0011】

悪化のより信頼できる血清マーカーを探す試みは、過去に繰り返し行われた。CRP又はESRは、通常、CF悪化において有用でない(Watkin et al., 1994, Pediatr Pulmonol 17: 6-10)。より洗練された潜在的マーカー、例えばインターロイキン又は組織壊死因子(TNF)は、全ての研究者によって有用なツールとして考えられているわけではない(例えば、Wolter et al., 1999, Immunol 6: 260-5)。Eichler et al.は、ヒト好中球のリボカリンをCF悪化のマーカーとして提案した(1999, Eur Respir J 14: 1145-9)。様々なサイトカインの痰のレベルは、検出可能であるが、痰を分析することはとても重大な意味を持つ(例え

50

ば、Karpati et al., 2000, Scand J Infect Dis 32: 75-9)。信頼できる試験は、気管支肺胞洗浄が必要とされることが多い。吐き出された一酸化窒素は、CFにおいて有用でないと示された(Grasemann et al., 1998, Arch Dis Child 78:49-53)。

【0012】

慢性炎症性腸(腸管)疾患、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎の病因学及び病原は、まだほとんど分かっていない。遺伝的変異から、通常の腸管内菌叢の構成物に対する失調性免疫反応、又は未知の抗原を削除できないことといった範囲にわたる生体病理学を説明するために、様々な仮定が提案されてきた(Sator, 1997, Am J Gastroenterol 92: 5S-11S)。メカニズムを始める際の明らかな違いにもかかわらず、クローン病及び潰瘍性大腸炎は、共通の免疫学的異常であって、進行中の炎症過程の状態を構成する異常を有する(Brandzaeg et al., 1997, Springer Semin Immunopathol 18: 555-589)。潰瘍性大腸炎並びにクローン病において観測された最も明らかな組織学的特徴の一つは、炎症の早い時点での好中球の炎症性粘膜への浸潤であった(Nikolaus et al., 1998, Gut 42: 470-476; Kucharzik et al., 2001, Am J Pathol 159: 2001-2009)。炎症性腸疾患における疾患活性は、好中球の粘膜への流入、及びそれに続く腸管ルーメンへの流入に関連しており、いわゆる腺窩膿瘍の形成をもたらす。腸管の上皮を通した好中球の移動は、細胞間接合の一過性の解放を引き起こすが、形態学的不連続を通常もたらさない(Nusrat et al., 1997, Gastroenterology 113: 1489-1500)。炎症性腸管疾患の炎症過程の間、好中球の浸潤を引き起こすと提案される潜在的な媒介物の一つは、上皮に由来されたインターロイキン-8(IL-8)である(Imada et al., 2001, Scand J Gastroenterol 36: 854-864; McCormick et al., 1995, J Cell Biol 131: 1599-1608)。活性化好中球は、様々な炎症誘導性サイトカイン及びケモカインを分泌し、それにより、単球、マクロファージ、リンパ球、及び顆粒球を含む様々な炎症性細胞の浸潤を引き起こす(Burgio et al., 1995, Gastroenterology 109: 1029-1038; Reinecker et al., 1993, Clin Exp Immunol 94: 174-181; Mazlam et al., 1994, Gut 35: 77-83; MacDermott et al., 1998, Inflamm Bowel Dis 4:54-67)。炎症性腸管疾患の炎症過程の間、最も重要な媒介物の一つは、腫瘍壊死因子 α (TNF α)であり、TNF α は、炎症性腸管疾患を患っている患者の腸管粘膜に発現する(Murch, 1998, Nutrition 14: 780-783; Breese et al., 1994, Gastroenterology 106: 1455-1466)。TNF α は、細胞内核因子 κ B(NF κ B)依存性シグナルカスケードを通した炎症を引き起こす。NF κ Bは、慢性炎症、例えば、炎症性腸管疾患における下流の過程にたいし、炎症誘導性サイトカイン遺伝子の転写を制御することによって、重要な役割を担う(Baldwin, 1996, Annu Rev Immunol 14: 649-683; Rogler et al., 1998, Gastroenterology 115: 357-369)。活動性クローン病を治療するための最近の治療計画は、TNF阻害剤、例えば、抗TNF抗体、例えばインフリキシマブを投与することを含む。

【0013】

炎症性腸疾患、特にクローン病及び潰瘍性大腸炎の疾患活性の診断は、例えば全身の状態の臨床観察を用いて主に評価される。このように、疾患の活性を信頼高く評価するための感受性が高い及び信頼できる疾患活性の生物学的マーカーへのニーズがある；しかしながら、試験された生物学的マーカー、例えばCRP；ESR、白血球及び血小板の数は、適切でないとわかった(Nielson et al., 2000, Am J Gastroenterol 95: 1894-1850)。

【0014】

S100A12、EN-RAGE、CAAF1及びp6タンパク質とも呼ばれるヒト・カルグラヌリンCは、カルシウム結合性S100タンパク質のファミリーに属する92のアミノ酸の小さいタンパク質である(Guignard et al., 1995, Biochem J 309: 395-401; US 5,976,832)。別の種におけるカルグラヌリンCのホモログは、ボスタウラス(Bos Taurus)(US5,976,832号)、ブタ(Dell'Angelica, 1994, J Biol Chem 269: 28929-23936)及びウサギ(部分配列:Yang et al., 1996, J Biol Chem 271: 19802-19809)から知られている。別のS100タンパク質と同様に、一般的な炎症において役割を担うと示唆され、しかしながらS100ファミリー内の炎症における役割は、それらのいくつかが炎症性細胞の機能を阻害する一方で他は活性化するという点で相反する。カルグラヌリンCは、炎症誘導性の役割を担うと提案された(Donato

, 2001, Int J Biochem Cell Biol 33: 637-668; Donato, 1999, Biochem Biophys Acta, 81450: 191-231; Yang et al., 2001, J Leukoc Biol 69: 986-994)。S100タンパク質は、炎症部位で増加しており、S100A8(ミエロイド関連タンパク質8、MRP8又はカルグラヌリンAと呼ばれる)及びS100A9(MRP14又はカルグラヌリンB)は、炎症疾患、例えばリュウマチ関節炎、炎症性腸疾患、及びCFにおいて見つかった(Golden et al., 1996, Arch Dis Child 74: 136-9; Frosch et al., 2000, Arthritis Rheum 43: 628-37; Roth et al., 2001, Lancet 357: 1041)。マウスS100A8の過剰発現は、マウスのCFモデルにおいて検出された(Thomas et al., 2000, J Immunol 164: 3870-3877)。

【0015】

カルグラヌリンCは、顆粒球により発現され、一方単球によるその発現は、議論の余地があるままである(Vogl et al., 1999, J Biol Chem 274: 25291-25296; Hofmann et al., 1999, Cell 97: 899-901; Yang et al., 2001, J Leukoc Biol 69: 986-994; Robinson et al., 2000, Biochem Biophys Res Commun 275: 865-870)。カルグラヌリンCは、活性化顆粒球により分泌される(Boussac et al., 2000, Electrophoresis 21:655-672)。細胞外機能は、別の強い走化性薬剤に匹敵する強力な走化性活性を含む(Hofmann et al. 1999, Cell 997: 889-901; Miranda et al., 2001, FEBS Lett 488: 85-90)。カルグラヌリンCは、マクロファージ、リンパ球、及び内皮で発現する最終糖化生成反応物受容体(RAGE)のリガンドである(Hofmann et al. 1999, Cell 97: 889-901)。タンパク質キナーゼを通じた細胞内シグナルは、異なるサイトカインの核因子(NF)- κ B-依存性分泌を引き起こす(Yeh et al., 2001, Diabetes 50: 1495-1504; Lander et al., 1997, J Biol Chem 272: 17810-17814)。NF- κ Bは、リュウマチ性関節炎及び乾癬性関節炎における滑膜炎の病原性において中心的な役割をになう(Danning et al., 2000, Arthritis Rheum 43: 1244-1256)。このように、カルグラヌリンCは、確かな受容体モデルが記述された最初のS100タンパク質である。EN-RAGE(つまり、細胞外で新たに同定されたRAGE結合タンパク質(extracellular newly identified RAGE-binding protein))という名前は、受容体作動性シグナル経路の中心的役割を強調するために提唱され、このシグナル経路は、阻害剤を用いた介入の魅力的な標的を提供しうる。

【0016】

ある炎症過程に直接的又は間接的に含まれるタンパク質は、とてもよくある。しかしながら、似たような症状を有する疾患間、特にSOJRAと細菌感染との間の区別をするために、特に川崎病及びCFにおける脈管炎の適切な治療のため疾患状態をモニターするために、そしてある病気、例えばJRAの再発の危険性を決定し、さらに適切な治療を決定するために、特異性のある診断マーカーに対するニーズがある。特に、慢性炎症疾患における急性悪化、特にCF急性悪化を同定することによる疾患状態の診断、及び患者の亜集団、特に、脈管炎、特に川崎病の患者であって、冠動脈問題を有する患者の亜集団を同定することによって、疾患状態の診断は、これらの疾患の適切な治療を可能にする。

【0017】

それゆえ、適切な薬物療法を適用するため、特に急性炎症性悪化の早い段階における、及び/又は再発の危険性を決定するための、及び/又は似たような症状を有する疾患を区別するための信頼できる診断ツールに対するニーズがある。

【0018】

それゆえ、適切な薬物療法を適用するために、信頼できる炎症マーカーをもちいて炎症疾患を診断するための、特に炎症疾患の特異的段階を診断するための、及び/又は再発の危険性を診断するための、及び/又は似たような症状を有する疾患の区別をするための新しい方法を提供することが、本発明の主要な目的である。

【0019】

治療の必要がある哺乳動物において炎症疾患の治療方法であって、信頼できる炎症マーカーに基づく治療方法を提供することは本発明の更なる目的である。予防の必要がある哺乳動物において炎症疾患の予防方法であって、信頼できる炎症マーカーに基づく予防方法を提供することは本発明の更なる目的である。

【発明の概要】

【0020】

発明の要約

本発明は、炎症性疾患の段階を診断するための、及び／又は、再発の危険性を決定するための、及び／又は似たような症状を有する疾患を区別するための方法であって、カルグラヌリンCのマーカーに基づく方法を提供する。さらに、本発明は、治療の本質的な部位として進歩性のある方法を含む、疾患の治療方法を提供する。

【0021】

本発明のある側面では、炎症疾患の診断方法は、以下のステップを含んで提供される：

第一に、診断される哺乳動物の体液又は組織の生物学的サンプルが取得される。生物学的サンプルは、細胞系列、生検、血液、タン、便、尿、滑液、創傷液、脳髄液、パラフィン内に包埋された組織、例えば目、腸、腎臓、脳、皮膚、心臓、前立腺、肺、乳房、筋肉、又は結合組織からの組織、及びそれら全ての可能性のある組み合わせを含みうる。

10

【0022】

次に、前記生物学的サンプル中に存在する、カルグラヌリンCポリペプチド及び／又はそのポリペプチドをコードする核酸の量及び／又は濃度が測定される。この測定は、非限定的に(i)カルグラヌリンCのmRNAを検出するプローブで生物学的サンプルについての切片上ハイブリッド形成法；(ii)カルグラヌリンCタンパク質を検出する抗体を用いて、生物学的サンプルの免疫組織化学的手法；(iii)生物学的サンプルにおけるカルグラヌリンCタンパク質の定量的計測；(iv)体液(例えば、全血液、血清、又は滑液)中におけるカルグラヌリンCタンパク質の計測；及び(v)例えば、生物学的サンプルにおいて起こる変化の指標として、PCRに基づく方法を用いてカルグラヌリンCmRNAを検出することを含むいくつかの技術のうちの一つを通して達成されうる。

20

【0023】

本発明に従った好ましい方法では、核酸プローブは、ポリペプチドをコードするカルグラヌリンC核酸の量及び／又は濃度を測定するために使われ、このプローブは、より好ましくは、配列番号1に記述される核酸配列由来である。前記プローブは、配列番号1に記載される核酸配列及び／又はその断片にハイブリダイズする核酸を、少なくとも部分的には含むようにデザインされる。プローブは、プローブが、配列番号1に記載の核酸配列とハイブリダイズする限りにおいて、このように、核酸誘導体のミスマッチ、及びストレッチ、例えば、ペプチド核酸を含みうる。好ましくは、プローブは、PCR反応、つまりポリメラーゼを含む別のテンプレート依存性伸張反応に使われうる。標準のハイブリダイズ条件は及びアッセイは、当業者に知られており、当該技術分野の標準文献で見つけることができる。さらに、PCR - に基づく技術は、定量に用いることができる。そういった技術は、非限定的に、rtPCR及び標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを含むPCRを含みうる。

30

【0024】

本発明に従った別の好ましい方法では、特異抗体が、カルグラヌリンCのポリペプチドの量及び／又は濃度を測定するために使われる。好ましくは、前記の特異的抗体は、配列番号2に記載されるアミノ酸配列由来のエピトープを認識する。抗体の作成及びエピトープの決定は、当業者によく知られており、当該技術分野の標準的な教科書的な文献において見つけることができる。好ましくは、前記抗体は、ポリクローナル抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体断片、一本鎖抗体、及び二重特異性抗体を含む群から選ばれる。さらにより好ましくは、前記抗体は、免疫測定法、例えば酵素免疫測定法(ELISA)、例えばELISA、又は免疫組織化学的方法を行うために使われる。

40

【0025】

ある特に好ましい方法では、生物学的サンプルにおける標的カルグラヌリンC分子は、レポーター分子で標識されているか又はされていない特異抗体に晒される。標的の量及びレポーター分子のシグナルの強さに依存して、結合された標的は、抗体で直接標識することにより検出されうる。変わりに、1次抗体特異的な、標識された2次抗体は、標的-1次抗体複合体にさらされて、標的-1次抗体-2次抗体の3次複合体を形成する。この複合体は、

50

レポーター分子によって放射されるシグナルによって検出される。

【0026】

本明細書において使われるとき、その化学的性質から、抗原に結合した抗体の検出を可能にする分析的に同定可能なシグナルを与える分子は、「レポーター分子」を意味する。検出は、定性的又は定量的でありうる。最もよくあることに、このタイプのアッセイにおいて使われるレポーター分子は、酵素、フルオロフォア又は放射性核種を含む分子(つまり放射性同位体)及び化学発光分子である。

【0027】

EIAの場合、通常グルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸によって、酵素は2次抗体に結合する。すぐに認められることであるが、広く多様な異なる結合技術が存在し、それらは当業者に容易に利用できるようになる。通常使われる酵素は、数ある中で、西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコース・オキシダーゼ、 β -ガラクトシターゼ、及びアルカリ・ホスファターゼを含む。対応する酵素によって加水分解されたとき、特異酵素と共に使われる基質は、通常、検出可能な色の変化を作り出すことで選ばれる。適切な酵素の例は、アルカリホスファターゼ及びペルオキシダーゼを含む。上記の色素産生基質よりむしろ蛍光産物を産出する蛍光発生性基質を用いることもできる。全ての場合、一次抗体ハブテン複合体に対し酵素標識された抗体が加えられ、結合を可能にし、そして次に超過量の溶液は洗い流される。適切な基質を含む溶液は、次に抗体-抗原-抗体の複合体に加えられる。基質は、2次抗体に結合した酵素と反応して、目に見える定性的なシグナルを与える。この定性的なシグナルは、通常分光測定でさらに定量されて、サンプル中に存在するハブテンの量の指標を与えらる。

10

20

【0028】

代わりに、蛍光性の化合物、例えばフルオレセイン及びローダミンが、抗体の結合能力を変えなく化学的に抗体へと結合されうる。特定波長の光の照射によって活性化されたとき、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸収して分子の励起状態を引き起こし、続いて光学顕微鏡で視覚的に検出可能な特徴のある波長の光を放出する。EIAの場合と同様に、蛍光標識された抗体は、一次抗体-ハブテン複合体に結合することを可能にした。未結合の溶液を洗い流した後に、残った3次複合体が、次に適切な波長の光にさらされ、そして観察された蛍光は、興味のあるハブテンの存在を示す。免疫蛍光及びEIA技術は、両方とも当該技術分野で十分に確立されており、本方法において特に好ましい。しかしながら、別のレポーター分子、例えば放射性同位体、化学発光、又は生物発光分子は、使用されうる。

30

【0029】

最終的に、例えばタンパク質分解酵素を用いてタンパク質をタンパク質分解性の切断をすること、及びそれに続いて、質量分光法、例えばMALDI-TOFにより分析することによって、カルグラヌリンCの発現を分析することは可能である。そういった方法は、当業者に知られている。

【0030】

次の段階として上記生物学的サンプルにおいて測定されるカルグラヌリンCのポリペプチドの量及び/又は濃度は、コントロールのサンプルにおいて測定されるカルグラヌリンCポリペプチドの量及び/又は濃度と比較される。上記生物学的サンプルにおいて測定されるカルグラヌリンCポリペプチドをコードする核酸の量及び/又は濃度は、コントロールのサンプルにおいて計測されるカルグラヌリンCポリペプチドをコードする核酸の量及び/又は濃度と比較される。そういった比較は、カルグラヌリンCの量及び/又は濃度の上記測定において獲得される情報に基づくだろう。データ又は情報は、記述された又は電子的な形態、つまり適切な貯蔵媒体上で存在しうる。比較は、診断設備において医師又は科学者によって手でかつ個々に、つまり目で行われるか、又は適切な機械、例えば適切なソフトウェアを装備したコンピューターによって行われうる。そういった装置は、病院の集中治療室におけるルーチンスクリーニングに好ましい。そういった方法のハイスループットの状況(つまり群)は、当業者に知られ、標準文献において記述される。

40

50

【 0 0 3 1 】

任意の段階として、前記生物学的サンプル及びコントロールのサンプルに存在する慣用の炎症マーカーポリペプチド及び／又はそのポリペプチドをコードする核酸の量及び／又は濃度が測定されうる。

【 0 0 3 2 】

炎症性疾患の過程において引き起こされるカルグラヌリンC以外のマーカーは、本明細書中に使われるとき、「慣用的マーカー」又は「慣用炎症マーカー」を意味する。本発明に従った好ましい方法に従って、前記慣用の炎症マーカーは、CRP、ヒト好中球のリボカリン、ESR、可溶性受容体、例えばFAS、及びサイトカインから成る群から選ばれる。そういった慣用マーカーは、炎症に関して単純な「プラス/マイナス」又は「炎症-有り/無し」の情報を提供する。本発明の目的のために、これらのマーカーは、内部コントロール、及び例えば炎症が存在しかつ急性であるところの時間定点を供給する。カルグラヌリンCを慣用のマーカー及び／又はコントロールサンプルにおける発現と比較することは、炎症疾患の診断、モニター、治療及び予防の付加的な実行可能な情報を提供するだろう。

10

【 0 0 3 3 】

実験が、本発明の完成の過程において行われるの間、カルグラヌリンCが、他の慣用マーカーと比較すると、その誘発(又は開始)がずっと早くそして異常なほど高い程度で起こる、初期炎症マーカーとして使われうることを、発明者は見つけた。このことは、ずっと早くそしてより効果的に炎症疾患の段階を診断することを可能にし、次にずっと早く、効果的にそして時間消費を少なく炎症性疾患を治療することを可能にする。発明のマーカーの使用、及び特に慣用の炎症マーカーと組み合わせての使用は、炎症を経験する患者の安楽を増大させる。

20

【 0 0 3 4 】

付け加えて、高い誘導は、明確な診断を提供し、そしてとても正しく炎症性疾患の段階をモニターすることを提供する。診断が行われうる好ましい炎症疾患は、特定の川崎病における脈管炎、嚢胞性線維症、慢性炎症性長疾患様の、例えば潰瘍性大腸炎又はクローン病、慢性気管支炎、炎症性関節炎疾患様の、例えば乾癬性関節炎、リウマチ性関節炎、および全身発症若年性リウマチ性関節炎(SOJRA、スティル病)を含む。カルグラヌリンCの誘発が、この疾患において最も特異的であるように思えるので、この場合における、発明の方法の使用は、特に好ましい。

30

【 0 0 3 5 】

炎症疾患の過程の異なる段階は、本明細書中で使われるとき、「炎症性疾患の段階」又は「疾患の段階」を意味する。そういった段階は、患者が上記疾患を経験する期間における早期、急性、そして退行性の段階を含む。疾患の段階は、現在の疾患の悪化、既往症に対する2次感染、慢性炎症の背景上の急性炎症、慢性炎症の背景所の後天性感染、再発の危険性、及び／又は疾患と似たような症状との区別を含む。

【 0 0 3 6 】

本発明に従った方法のある側面においては、炎症性疾患は、慢性炎症の背景上の急性炎症である。本発明に従った方法の別の側面では、炎症性疾患は、慢性炎症性疾患の背景にもとづいた後天性感染である。本発明に従った方法のさらに別の態様では、炎症性疾患は、既往症の悪化である。

40

【 0 0 3 7 】

好ましくは、本発明に従った方法は、炎症性疾患の特異的段階を診断するため、及び／又は再発の危険性を決定するため、及び／又は疾患と似たような症状との区別をつけるために使われる。好ましくは、本発明の方法に従った診断は、予防の基礎として及び／又は炎症性疾患のモニターとして役に立つ。

【 0 0 3 8 】

疾患の段階はたいてい、及び特に炎症性疾患の段階は、医師によって観察される治療上の症状に基づいて頻繁に診断される。この診断に基づいて、(疾患の重症度に対応する多くの場合における)段階は評価される。それにもかかわらず、見た目の診察及び慣用の血

50

液炎症マーカーに基づく「古典的な」診断に加えて、最近の診断では、炎症マーカーの分析が、炎症性疾患の段階を分析するための付加的なツールになってきている。診断に適したマーカーのこのファミリーの顕著な慣用のマーカーは、C反応性タンパク質(CRP)である。それにもかかわらず、このマーカーは、炎症に対する反応性が極めて遅く、そして、全ての場合において非炎症性発現に比較してとても高い割合で引き起こされるわけではない。例えば、疾患の段階は、急性の発症、悪化、軽減として名づけられており、熱及びほかの症状を含みうる。さらに、本発明は、健康に見えるが、疾患の再発の危険性を有する患者においてさえ疾患を診断することを可能にする。感染を「受けてない」患者と対照的に、ヒトが、それぞれの炎症疾患の少なくとも1の段階を既に経験したということは、「再発」という用語を意味する。本発明は、経験した疾患と、新しく獲得された疾患との区別を含む。

10

【0039】

疾患の段階の分析及び類別の例は、リウマチ性関節炎の場合を本明細書中に(非限定的に)記述される。リウマチ性関節炎は、何年も続きうる。疾患の進行(つまり段階)は、5の異なる発展段階によって分類される。段階1：共通のサイン又は症状を全く経験しないが、インフルエンザのような病気にかかりうる。段階2：小さい関節、例えば手、手首、ひざ、及び足においてちょっとした痛みと肥大を経験する。全身の連続的な肉体的不快感を経験しうる。関節のX線写真は、この段階では健常に見えるだろう。段階3：冒された関節は熱を持ちそして腫大する。朝の硬直、冒された関節の動きの制限、及び全身のかつ進行性の肉体的不快感及び脱力感を経験する。段階4：段階3で経験した症状がさらに明白になる。段階5：段階4より症状はさらに明白になる。冒された関節の機能の欠如を経験する。変形が起こることが多い。疾患のこの段階の間、関節の周りの骨は腐食され、靱帯が伸びる。さらに合併症、例えば腱断裂、足潰瘍、シューグレン症候群、手根管症候群を起こしうる。

20

【0040】

さらに本発明の別の側面において、本発明に従った方法は、カルグラヌリンCのポリペプチド及び/又はそのポリペプチドをコードする核酸の量及び/又は濃度を測定することを含み、カルグラヌリンCのポリペプチド及び/又はそのポリペプチドをコードする核酸の量及び/又は濃度を局所マーカーとして測定することを含む。炎症疾患の部位で直接生産されるマーカーは、本明細書中で使われるとき、「局所マーカー」のことを意味する。局所マーカーは、感染及び/又は炎症刺激に対する全身の反応として産生される慣用マーカーと対照的に、静置する。こういったマーカーは、数ある中で、CRP、ヒト好中球のリボカリン、ESR、可溶性受容体、例えばFas、及びサイトカインを含む。対照的に、カルグラヌリンCは、滑液において見られて、その局所的な生産を示しうる。健康であるように見えるが、その疾患の増大する再発の危険性を有する、JRA-患者に関する場合に見られるように、局所マーカーは、疾患の再発の可能性を分析することにおいて特別有利な点を有する。それにもかかわらず、マーカーとしてカルグラヌリンCを使用することは、局所的炎症に限られない。なぜならこのマーカーは、(時間点にしてちょっと後だが、)例えば患者の血清においても存在するからである。

30

【0041】

上で述べた様に、本発明の方法は、その治療を必要とする対象(つまり哺乳動物)における炎症性疾患の治療方法の基礎を形成しうる。このように、本発明の別の側面では、本発明は、その治療を必要とする哺乳動物における炎症性疾患の治療方法であって、a)上記の本発明の方法に従いステップa)からc)を行い；そして、b)治療を必要とする哺乳動物を医薬治療すること；を含み、ここで、前記医薬治療は、治療される疾患の段階に基づいている。本明細書中で使われるとき、炎症症状の減退を手助けする及び促進するための薬物、薬物治療学、及び/又は運動の使用は、「医薬治療」又は「薬物療法」を意味する。医薬治療は、熟練の医師によって特異的に処方される薬品又は薬品の組み合わせを用いて古典的に行われる。それにもかかわらず、薬物療法という用語は、薬物の経口摂取のみに限定すべきでなく、処置された患者に対し利得を示す潜在的な治療の仕方全てを含みうる。

40

50

【 0 0 4 2 】

薬物療法が、治療される疾患の段階に基づくという事実のために、医師は、治療計画及び/又は、炎症疾患を治療するために処方される及び用いられる薬物の集合を通常変化させる。この変化は、本発明の方法に従った診断の結果に基づいており、治療が、患者に対しより早く、より特異的に、そしてさらにより効果的であることを可能にするだろう。さらに、初期の薬物療法は、コストを抑え、病院に滞在する必要性を減らし、そして家での外来治療を可能にするだろう。このことは、患者の快適性をさらに増加させるだろう。治療計画の変化は、本発明に従った診断に基づいており、この場合、疾患の段階及び薬物療法の成果を「モニター」することによって記述されうる。さらに、化学療法薬、例えばMTXでの治療の間に起こる重度の副作用は、患者の再発の危険性が低い又は全く存在していないと診断される場合においては、避けられうる。

10

【 0 0 4 3 】

本発明に従った好ましい治療方法では、慣用の炎症マーカーは、CRP、ヒト好中球リボカリン、ESR、可溶性受容体、例えばFas、及びサイトカインから成る群から選ばれる。多くの場合、そういった慣用のマーカーは、炎症に関して、単純な「プラス/マイナス」又は「炎症-有り/無し」の情報を提供する。本発明の目的では、これらのマーカーは、内部コントロール、及び例えば炎症が存在しかつ急性であるところの時間定点を提供する。カルグラヌリンCを慣用のマーカー及び/又はコントロールサンプルにおける発現と比較することは、炎症疾患の診断、モニター、治療及び特に予防の付加的な実行可能な情報を提供するだろう。

20

【 0 0 4 4 】

本発明に従った好ましい治療方法では、炎症性疾患は、局所的炎症性疾患である。そういった局所的炎症は、全身性感染及び/又は炎症、例えば敗血症又は細菌毒素ショック症候群に対照的に静置する。

【 0 0 4 5 】

本発明に従った別の好ましい治療方法では、炎症疾患は、脈管炎、特に川崎病である。本発明のさらに別の好ましい治療方法では、炎症性疾患は、嚢胞性線維症である。本発明に従ったさらに別の好ましい治療方法では、炎症性疾患は、慢性炎症性腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎、クローン病、又は慢性気管支炎である。本発明に従ったさらに別の好ましい治療方法では、炎症性疾患は、炎症性関節炎疾患、例えば乾癬性関節炎又はリウマチ性関節炎である。炎症性疾患が、全身発症若年性リウマチ性関節炎(SOJRA)であるところにおいて、本発明に従った治療方法は、特に好ましい。

30

【 0 0 4 6 】

このように、本発明に従った治療方法の別の側面に従って、炎症性疾患は、慢性炎症の背景上の急性炎症である。本発明に従った方法の別の側面では、炎症性疾患は、慢性炎症性疾患の背景上の後天性感染である。本発明に従った方法のさらに別の側面では、炎症性疾患は、既往症の悪化である。

【 0 0 4 7 】

上記のとおり、本発明の方法は、予防の必要がある対象において、炎症性疾患の予防方法に対する基礎を形成しうる。このように、本発明のさらに別の側面では、本発明は、予防を必要とする哺乳動物において炎症性疾患の予防方法を提供し、この予防方法は以下のステップ：a)請求項1のa)からc)のステップを行い；そしてb)上記治療を必要とする哺乳動物を医薬治療することを含み、ここで上記医薬治療は、予防される治療の段階に基づいている。本発明の脈絡では、「予防」という用語は、「古典的な」症状(例えば、上記のとおり、例えば、慣用マーカーの誘導)を示さないが、上の本発明に従った方法によって診断されうる疾患、例えば再発危険性の特異的治療を意味する。本発明の診断情報に基づき、医師は、治療計画及び/又は炎症性疾患を予防(治療)するために処方され及び使用される薬剤の集合で治療を始め(例えば変え)るだろう。本発明の方法の診断結果に基づく、治療の「早い始まり」は、慣用マーカーを用いるより効果的な予防を可能にし、そして患者のより効果的な予防を可能にする。さらに、初期の薬物療法は、コストを抑え、病院に

40

50

滞在する必要性を減らし、そして家での外来治療を可能にするだろう。このことは、患者の快適性をさらに増加させるだろう。最後に、本発明の方法を用いて、疾患の再発危険性を診断するための可能性は、そういった治療が必要である場合においてのみ治療を可能にし、例えば、化学療法薬、たとえばMTX及び/又は抗体、例えばインフリキシマブで治療される患者の副作用を避け及び/又は減じる。

【0048】

本発明にしたがった好ましい予防方法では、慣用の炎症マーカーは、本発明に一致して通常使われ、慣用炎症マーカーは、CRP、ヒト好中球リボカリン、ESR、可溶性受容体、例えばFAS、及びサイトカインから成る群から選ばれる。そういった、慣用マーカーは、炎症に関して単純な「プラス/マイナス」又は「炎症-有り/無し」の情報を提供する。本発明の目的のために、これらのマーカーは、内部コントロール、及び例えば炎症が存在しかつ急性であるところの時間定点を供給する。カルグラヌリンCを慣用のマーカーと比較すること、及び/又はコントロールサンプルにおける発現を比較することは、炎症疾患の診断、モニター、治療及び予防の付加的な実行可能な情報を提供するだろう。

10

【0049】

本発明に従った好ましい予防方法では、炎症疾患は、局所的炎症性疾患である。そういった局所的炎症は、全身性感染及び/又は炎症、例えば敗血症又は細菌毒素ショック症候群と対照的に、静置する。これらの場合、炎症の予防は、付加的な利得を有して、局所的感染の拡大及び局所から全身(つまり局所的でない)への炎症の発達を阻害するだろう。それにもかかわらず、このマーカーが、(ちょっと後の時間においてだが)患者の例えば血清にも存在することから、カルグラヌリンCのマーカーとしての使用は、局所的炎症に限られるべきでない。

20

【0050】

本発明に従った別の好ましい予防方法では、炎症性疾患は、脈管炎、特に川崎病である。本発明の別の好ましい予防方法では、炎症性疾患は、嚢胞性線維症である。本発明に従ったさらに別の好ましい方法では、炎症性疾患は、慢性炎症性腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎又は、クローン病、又は慢性気管支炎である。本発明に従ったさらに別の好ましい方法では、炎症性疾患は、炎症性関節炎疾患、例えば、乾癬性関節炎、又はリウマチ性関節炎である。炎症性疾患が、全身発症若年性リウマチ性関節炎(SOJRA)であるところにおいて、本発明の予防方法は特に好ましい。

30

【0051】

本発明に従った予防方法の別の側面によると、炎症性疾患は、慢性炎症の背景上の急性炎症である。本発明に従った方法の別の側面では、炎症性疾患は、慢性炎症性疾患の背景上の後天性感染である。さらに本発明に従った方法の別の側面では、炎症性疾患は、既往症の悪化である。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】抗生物質治療の前及び後のCF患者血清におけるカルグラヌリンCの濃度を示す。図1は、CF患者の結成におけるカルグラヌリンCの濃度が、抗生物質での治療されると減少することを示す。

40

【0053】

【図2A】CF患者における炎症マーカー(カルグラヌリンC、白血球数、CRP、及びESR)の比較を示す。サブグループ: 1)抗生物質治療の開始前の急性悪化を患うCF患者(n=21)、2)抗生物質治療の終わりにおけるCF患者(n=21)、3)CF外来患者(n=20)、4)急性悪化を患うCF患者のタン(n=10)。カルグラヌリンC濃度は、血清(1~3)及びタン(4)において計測された。データは、平均値として表され、エラーバーは、95%の信頼区間を示す。灰色の線は、通常範囲の上限を示す。図2は、白血球数、CRP、及びESRに比較して、急性CF悪化の最も感受性の高いマーカーとして、カルグラヌリンCを表す。カルグラヌリンC濃度だけが、抗生物質治療の開始前の急性悪化と、抗生物質治療後の及び外来患者の状況との間の有意差を示す。

50

【図2B】CF患者における炎症マーカー(カルグラヌリンC、白血球数、CRP、及びESR)の比較を示す。サブグループ：1)抗生物質治療の開始前の急性悪化を患うCF患者(n=21)、2)抗生物質治療の終わりにおけるCF患者(n=21)、3)CF外来患者(n=20)、4)急性悪化を患うCF患者のタン(n=10)。カルグラヌリンC濃度は、血清(1~3)及びタン(4)において計測された。データは、平均値として表され、エラーバーは、95%の信頼区間を示す。灰色の線は、通常範囲の上限を示す。図2は、白血球数、CRP、及びESRに比較して、急性CF悪化の最も感受性の高いマーカーとして、カルグラヌリンCを表す。カルグラヌリンC濃度だけが、抗生物質治療の開始前の急性悪化と、抗生物質治療後の及び外来患者の状況との間の有意差を示す。

【0054】

10

【図3】川崎病のモニターにおける血清マーカーCRP及びカルグラヌリンCを示す。1)治療の開始前、2)γグロブリンの静脈内投与後、3)2週間後、4)寛解時の時間点を示す。データは、平均値として表され、エラーバーは95%の信頼区間を示す。灰色の線は、通常範囲の上限を示す。アスタリスクは、統計的有意差を示す。図3は、カルグラヌリンがCRPと比較して、γグロブリン治療の後と前との疾患の炎症状態の差を示すために適切であるということを示す。

【0055】

【図4】川崎病を患う患者の異なる群の平均血清レベルを示す。A)冠動脈病変を患う患者にける初期レベル、B)冠動脈病変を患っていない患者における初期レベル、C)冠動脈病変を患っている患者における最大レベル、D)冠動脈病変を患っていない患者における最大レベル。図4は、冠動脈病変の高い危険性がある場合を同定する際に、CRPより優れたものとしてカルグラヌリンCを示す。

20

【0056】

【図5】コントロールのヒト(コントロール)、JRA患者(JRA)、SOJRA患者(SOJRA)、及び細菌性感染を患う患者の血清カルグラヌリンC濃度、並びにJRA患者の滑液(JRA-SF)におけるカルグラヌリンC濃度を示す。図5は、血清カルグラヌリンCを、SORJAとJRA又は細菌性感染との間の区別をできる感受性の高いマーカーとして示す。

【0057】

【図6】乾癬性関節炎(PsA)、リウマチ性関節炎(RA)、及び血清陰性関節炎(SA)それぞれを患う患者、並びにコントロールにおいて、血清中のカルグラヌリンC濃度(A)及び滑液中のカルグラヌリンC濃度(B)の比較を示す。(* $P < 0.05$)。図6は、カルグラヌリンCを、関節炎製炎症を示す血清マーカーとして示す。

30

【0058】

【図7】滑膜の生検におけるカルグラヌリンCの発現を示す。実質的に、関節炎を患っていないコントロールの滑膜組織において、カルグラヌリンCは見つからなかった(A)、一方リウマチ関節炎を患う患者の炎症性滑膜組織において過度に発現した(B)。血清陰性関節炎における発現パターンは、リウマチ関節炎の発現パターンと似ていた(示さず)。CD163陽性マクロファージは、浸潤における最も豊富な細胞タイプであったが、カルグラヌリンC-陽性細胞と異なる分布を示した(C)。二重標識研究の免疫蛍光顕微鏡は、浸潤しているCD15陽性好中球によって、カルグラヌリンCの発現の発現を立証した。2重標識された細胞は、色の重なりのため黄色に見える(D)。図7Dの挿入された小さい画像は、抗カルグラヌリンC-テキサスレッド(赤；上図)及びCD15-FITC(緑；下図)の二つの蛍光色素の両方に対するそれぞれ単一の波長での発光を示す。乾癬性関節炎では、カルグラヌリンCは、血管周囲のパターンを有するサブライニング層において優先的に発現された。カルグラヌリンCの発現は、小血管周囲において、及び血管周囲の好中球浸潤において最も印象的であった(E)。カルグラヌリンCは、血管内皮にくっつき、そして乾湿組織内に浸潤する顆粒球によって発現された。カルグラヌリンCは、好中球と内皮が接触した際に、放出されるようだ(F)。強いカルグラヌリンCの発現が、乾癬性関節炎を患い、MTX治療を受ける前の患者の滑膜組織において見つかった(G)。一方、効果的なMTX治療の後の同じ患者の滑膜において、カルグラヌリンCの発現は、ほとんど検出できないほどであった(H)。スケールバ

40

50

ーは、100 μ Mである。図7は、滑膜生検を用いて、カルグラヌリンCを局所的な関節炎の炎症のよいマーカーであると示す。

【0059】

【図8】最初の状態で活動性の乾癬性関節炎を患う患者及び、MTXの処理後の乾癬性関節炎を患う患者におけるカルグラヌリンCの血清濃度を示す。図8は、血清カルグラヌリンCを、乾癬性関節炎における治療の成功をモニター(計測)することを可能にする感受性の高いマーカーとして示す。

【0060】

【図9】クローン病及び潰瘍性大腸炎におけるカルグラヌリンC、CRP、及びESRの血清濃度を示す。カルグラヌリンCは、40のクローン病患者、34の潰瘍性大腸炎患者、及び30の健康なコントロールにおいて計測された。CRPは、15のクローン病患者、及び26の潰瘍性大腸炎患者で計測された。ESRは、28のクローン病患者、及び26の潰瘍性大腸炎患者で計測された。丸は、患者の個々の血清レベルを示す。菱形は、平均値の値を示す。エラーバーは、95%の信頼区間を指す(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。図9は、カルグラヌリンCを、クローン病及び潰瘍性大腸炎、における活動性炎症のよい血清マーカーとして示し、さらに、カルグラヌリンCは、潰瘍性大腸炎において疾患の活動性の優れたマーカーであることを示す。

10

【0061】

【図10】カルグラヌリンCレベル及びESRデータの個々の追跡調査。潰瘍性大腸炎(a)及びクローン病(b)をそれぞれ患う患者において、カルグラヌリンC、ESR、及びCAI/CDAIの個々のコースが示される。データは、炎症性腸疾患を有する10の患者の代表である。図10は、カルグラヌリンC血清濃度と疾患活性とのよい相関を示す。

20

【0062】

【図11】インフリキシマブ治療による、クローン病を患う患者におけるカルグラヌリンC血清レベルの変化。インフリキシマブでの治療前、治療後2週間、治療後4週間におけるカルグラヌリンC及びCDAIの個々の経過(a~c)。図11は、カルグラヌリンC血清濃度と、疾患の活動性とのよい相関を示す。

【0063】

【図12】活動性のクローン病又は潰瘍性大腸炎を患う患者から由来の組織におけるカルグラヌリンCの発現。免疫組織学的染色は、活動性クローン病を患う患者の炎症性結腸組織におけるカルグラヌリンCの過度の発現を示した(A)。カルグラヌリンC陽性細胞は、クローン病における肉芽腫瘍性病変の周囲を取り囲む(B)。カルグラヌリンCの似たような局所的な発現は、潰瘍性大腸炎において見られた(C)。多くのカルグラヌリンC-陽性細胞は、潰瘍性大腸炎の腺窩膿瘍に集まった(D)。連続的な切片の染色は、カルグラヌリンC-陽性細胞(E)とCD15-陽性細胞(F)の共局在を明らかにした。腺窩膿瘍の破壊の際、カルグラヌリンC-陽性好中球は、内皮からルーメンへと移動した(G)。抗カルグラヌリンC-テキサスレッド(赤)及びCD15-FITC(緑)を用いた2重標識研究の免疫蛍光顕微鏡は、明らかに浸潤するCD15陽性好中球によるカルグラヌリンCの発現を示した(H)。2重標識された細胞は、色の重なりにより黄色に見える。(H)に挿入された小さい図は、両方の蛍光色素のどちらかの単一波長での発光を示す。スケールバーは、100 μ Mを指す。図12は、カルグラヌリンCを腸組織の局所的炎症のよいマーカーとして示す。

30

40

【0064】

【図13】寛解したJRA患者であって、残存の炎症活性の治療上又は検査上の兆候を全く持たないJRA患者のカルグラヌリンCの血清濃度を示す。グループ1の患者(X軸上の1)は、MTX治療を止めた後12ヶ月の内に再発した患者であり、12ヶ月以上の寛解を示したグループ2の患者(X軸上の2)のカルグラヌリンCの血清濃度より優位に高いカルグラヌリンCの血清濃度を得た。図13は、カルグラヌリンCが、寛解したJRA患者の再発の危険性に対するマーカーとして適切であるということを示す。

【0065】

【図14】TNF α で刺激した後の好中球の上清における、カルグラヌリンCの濃度を示す。

50

細胞は、処理されないまま(w/o)又はTNF α で、15分、及び30分それぞれ刺激された(* * P < 0.01; n = 3)。図14は、刺激されたヒト好中球からのカルグラヌリンCの分泌を示す。

【発明を実施するための形態】

【0066】

好ましい態様の詳細な記述

本発明は、以下の例によって、添付の図に関してさらに記述される。全ての実施例は、例の方法によって提供されており、本発明の特許請求の範囲を制限するつもりを有さない。全ての引用された文献はその全てを本明細書中に援用する。

【0067】

配列番号2は、カルグラヌリンCのポリペプチド配列を記し、そして配列番号1は、そのポリペプチドをコードするカルグラヌリンC核酸配列を記す。

10

【0068】

驚くべきことに、ヒト・カルグラヌリンCを標的とする、アフィニティで精製されたポリクローナルウサギ・抗血清が、適切な薬物を適用するために、炎症性疾患を診断し、炎症疾患の特異的段階を診断し、及び/又は再発の危険性を決定し、及び/又は似たような症状を有する病気間の区別をする方法において有用であるということを示しうる。

【0069】

配列番号2に従ったカルグラヌリンCポリペプチド、及び/又は配列番号1に従ったこのポリペプチドをコードする核酸、及び/又はこのポリペプチドに対する抗体は、驚くべきことに、これらの特異的診断の必要性に有用であると発見された。

20

【0070】

添付の図において表され、及び以下の例で議論された結果は、カルグラヌリンCが、例えば急性CF悪化の強力なマーカーであるということを示す。カルグラヌリンC血清濃度は、健康なコントロールと比較して、悪化を有するCF患者において有意に上昇する。さらに、血清レベルは、個々の患者の疾患活性に関連した。全ての患者において、カルグラヌリンC濃度は、抗生物質治療の間減少した(図1)。通常範囲内の初期血清レベルを有する4つの場合でさえ、減少が検出されて、個人の特性が、一回の血清試験より有用であるということを示し示しうる。カルグラヌリンCは、慣用のマーカー、CRP、ESR、及び白血球数より、急性悪化に対する感受性の高い指標である(図2)。治療前と後の急性悪化を有する患者の間の、並びに、急性悪化を有する患者とCF外来患者との間の高い有意差を有する、唯一のパラメーターである。

30

【0071】

さらに、カルグラヌリンCは、脈管炎、特に川崎病の過程をモニターするための(図3)、及び追加の動脈病変を患う患者の予後に対する(図4)強力なマーカーである。

【0072】

カルグラヌリンCは、炎症性関節炎疾患(図5,6,8、及び13)並びに炎症性腸疾患(図9,10、及び11)における疾患活性の全身性のマーカーである。

【0073】

さらに、生検及び組織標本をそれぞれ使うとき、カルグラヌリンCは、局所的炎症を検出するマーカーである(図7及び12)。

40

【0074】

結局、カルグラヌリンCは、標準の慢性的疾患から、感染のため起こる急性炎症を、区別するための強力なマーカーである。

【実施例】

【0075】

実施例1：嚢胞性線維症(CF)患者における急性の悪化の有利なマーカーとして、ヒト・カルグラヌリンCの同定

カルグラヌリンCの調製

カルグラヌリンCを以前詳細に記述された(Vogl et al., 1999, J Biol Chem 274: 2529 1-25296; van den Bos, 1998, Prot Expr Purif 13: 313-318)とおり、ヒト顆粒球から

50

単離した。

【0076】

抗 - カルグラヌリンC抗血清の調製

ヒト・カルグラヌリンCに対するアフィニティーで精製されたポリクローナルウサギ抗血清を以前報告された(Vogl et al., 1999, J Biol Chem 274: 25291-25296; van den Bos, 1998, Prot Expr Purif 13: 313-8)とおりに調製した。ウサギ抗 - ヒト・カルグラヌリンC抗体の単一特異性精製度を、精製されたヒト及び組換えカルグラヌリンCに対する免疫反応性によって、及び顆粒球のライセートのウェスタンブロット分析によって分析した。

【0077】

サンドウィッチELISAによる、カルグラヌリンC濃度の測定

患者の血清におけるカルグラヌリンCの濃度を、ダブル・サンドウィッチ酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)システムにより測定した。平底96穴マイクロ・タイター・プレート(Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark)を、0.1M炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6内の10ng/ウェルの抗 - カルグラヌリンC50 μ l/ウェルでコートし; 16時間4℃でインキュベーションし、; 0.1% Tween 20を含み、pH7.4のリン酸緩衝液(洗浄液)で3回洗い; そして、0.25% ウシ血清アルブミンを含む洗浄液(ブロック緩衝液)で1時間37℃でインキュベーションした。プレートを、洗浄緩衝液で1回洗い、そしてブロック緩衝液で様々な希釈した50 μ lのサンプルを、室温で1時間添加した。ELISAを0.016 ~ 125ng/mlの濃度範囲の精製されたカルグラヌリンCで較正された。アッセイは、0.5と10ng/mlの間の直線範囲を及び<0.5ng/mlの感受性を有した。3回の洗浄後、20ng/ウェルのビオチン標識されたウサギ抗ヒト・カルグラヌリンCを添加し、そして30分で37℃インキュベーションした。プレートを3回洗い、そしてストレプトアビジン結合西洋わさびペルオキシダーゼ(1:5000希釈; Pierce, Rockford, Illinois, USA)で37℃30分インキュベーションした。3回洗浄後、プレートをABTS(2,2'-アジノビス(3-エチルベンズチアゾリン・スルホン酸); Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)及びH₂O₂(25ml 0.05Mクエン酸緩衝液、pH4.0中10mgABTS及び10 μ l H₂O₂(30%))で20分間室温でインキュベーションした。405nmの吸収を、ELISA-リーダー(MRX マイクロプレートリーダー-Dynatech Laboratories, St Peter Port, Guernsey, UK)で計測した。

【0078】

患者及び健常者コントロール

抗生物質治療の始め及び終わりにおける急性悪化の21コース上の静脈投与抗生物質治療を受けた17人のCF入院患者(9人の少年、8人の少女; 調査に入った時の平均年齢は、21.1歳であり、10~35歳の範囲であった)のカルグラヌリンC血清濃度が測定された。実際の治療の入院平均期間は、2週間であった。入院の主要な理由は、健康状態の全体的悪化、粘稠性タン、及び増殖性の咳の増加であった。

【0079】

別の理由から20の場合で血液サンプルを採取された、急性悪化を有しない18人のCF外来患者(10人の少年、8人の少女; 平均年齢21.8歳で、8~31歳の範囲)は、同じ炎症性パラメーター及びカルグラヌリンCの検出を調査された。急性悪化を有する5人のCF-患者のタンサンプルも分析した。

【0080】

炎症の兆候を持たない18人の健常成人(平均年齢31.9歳; 19~43歳の範囲)および、16人の小児(平均年齢10.9歳; 3~17歳の範囲)における、カルグラヌリンCの血清レベルが評価された。一緒に、34人の通常のコントロール(平均年齢22.0歳; 3~43歳の範囲)が調査された。

【0081】

統計分析

異なる分類間のカルグラヌリンC発現の差を決定するためスチューデントのT検定が行われた。データは、平均値 $\pm$ SDとして表される。0.05より大きいP値は、有意差なしとした。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

カルグラヌリンC分析の結果

通常のカルグラヌリンCの平均値は、健常成人のコントロールでは $64 \pm 36 \text{ ng/ml}$ であり、健常小児では $50 \pm 32 \text{ ng/ml}$ であった。健常者のコントロールにおける全体の平均値は、 57 ng/ml であった。年齢又は性別の違いによる有意差は無かった。

【 0 0 8 3 】

急性悪化を有するCF患者は、カルグラヌリンCの血清レベルを上昇させる(平均値 381 ng/ml 、範囲 $40\text{--}1429 \text{ ng/ml}$; $P < 0.01$)。21のケースの内17では(81%)、カルグラヌリンCの血清レベルは、通常の前平均値 + 2倍の標準偏差異常であった。静脈内抗生物質治療の2週間後、これらの患者におけるカルグラヌリンCレベルの平均値は、 130 ng/ml ($17 \sim 524 \text{ ng/ml}$ の範囲)まで減少した。悪化を有しないCF外来患者のカルグラヌリンCレベルの平均値は、 126 ng/ml ($35 \sim 320 \text{ ng/ml}$ の範囲)であった。治療前と治療後との間の急性悪化を有する患者のカルグラヌリンCの平均値に有意差がある。急性悪化を患うCF患者のタンにおけるカルグラヌリンCレベルの平均値は、 $5,600 \pm 4,350 \text{ ng/ml}$ であった。

【 0 0 8 4 】

急性悪化の21のケースにおけるカルグラヌリンCレベルの個々のタイムコースは、図1に示される。抗生物質治療の開始で、極端に高いレベルで提示されるとき、全ての患者が、通常範囲内の値に到達するわけではなかった。

【 0 0 8 5 】

比較のための炎症性パラメーター

抗生物質治療の開始前における急性悪化の21のケースのうち13のケース(61%)では、CRPが上昇するということを見つけた。抗生物質治療前の急性悪化を患う患者のCRP濃度($1.87 \pm 2.94 \text{ mg/dl}$; $0 \sim 10.6$ の範囲)と抗生物質治療後のCRP濃度($0.15 \pm 0.39 \text{ mg/dl}$; $0 \sim 1.6$ の範囲)との間の平均値に有意差があった。それにもかかわらず、急性の悪化と、急性感染を患わない外来患者($0.52 \pm 0.40 \text{ mg/dl}$; $0\text{--}1.5$ の範囲)との間の平均値の差は、有意ではなかった。ESRは、21のケースのうち14のケース(66%)において通常範囲を超えていた。我々は、急性悪化を有する患者のESR平均値($25 \pm 18 \text{ mm/h}$; $4\text{--}51$ の範囲)と外来患者のESR平均値($12 \pm 9 \text{ mm/h}$; $1 \sim 28$ の範囲)との間の有意差を見つけた。抗生物質治療の前及び後の急性悪化を患う患者のESR($17 \pm 15 \text{ mm/h}$; $6\text{--}36$ の範囲)は、有意差が無かった。12のケース(56%)では、白血球数は、 $10,000/\mu\text{l}$ を超えた。白血球数は、急性悪化において、抗生物質治療の前($11,260 \pm 3,948/\mu\text{l}$; $2,900\text{--}22,100$ の範囲)と後($7,920 \pm 2,311/\mu\text{l}$; $2,500\text{--}12,500$)で有意に高かったが、治療前の急性悪化を有する患者と外来患者($9,583 \pm 3,438/\mu\text{l}$; $4,300 \sim 16,500$ の範囲)との間でそういった差は見つからなかった。データは、図2に要約される。

【 0 0 8 6 】

カルグラヌリンCは、それゆえ、急性CF-悪化のマーカーとして強力でありかつ信頼できる。カルグラヌリンCは、炎症の早いマーカーであり、疾患の活動性と関連がある。カルグラヌリンCは、慣用の炎症指標より、急性と慢性の疾患段階を区別する点で優れている。特に、カルグラヌリンC各プロファイルの血清レベルの測定は、急性悪化の状態を決定するために有用である。

【 0 0 8 7 】

上記の例は、特に、本発明の治療及び/又はモニターのためのカルグラヌリンCの使用を示す。

【 0 0 8 8 】

例2：川崎病をモニターする際に有用なマーカーとしてのカルグラヌリンCの同定患者と健常者コントロール

我々は、川崎病の診断基準を満たし、静脈内 γ グロブリン(2 g/kg 体重)で処理された6の女性患者及び15の男性患者のカルグラヌリンCを上記ELISA法を用いて、並びにCRPのレベルを分析した。川崎病患者の血清におけるカルグラヌリンCの濃度は、例1に記載されるダブル・サンドウィッチ酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)システムによって測定された。

10

20

30

40

50

また、タンパク質及び抗体調製は、上記のとおりに行われた。血清サンプルは、治療の開始時、 γ グロブリンの処置後直に、治療開始後2週間で、及び寛解時において採取された。熱の平均期間は、7.5日(5~13日の範囲)であった。白血球数の平均最大値は、 $14,900/\mu\text{l}$ ($5,300 \sim 24,400$ の範囲)であり、平均63%の好中球を有する。8の患者は、冠動脈病変(CAL)を有し、及び、冠動脈動脈瘤と診断された。CALを患う全ての患者は男性であった。CALを患う患者と患わない患者との間の年齢における有意差は無かった(平均年齢2.4対2.6歳)。CALを患う患者は、熱、及び高レベルのカルグラヌリンC、CRP、白血球数及び好中球数の長い期間を有した。

【0089】

カルグラヌリンC分析の結果

治療前の初期カルグラヌリンCレベルの平均値は、 $450 \pm 348\text{ng/ml}$ ($31 \sim 1,330\text{ng/ml}$ の範囲)であった。カルグラヌリンCレベルの平均値は、 γ グロブリン治療のち有意に減少した($236 \pm 244\text{ng/ml}$; $9 \sim 1071$ の範囲; $P < 0.05$)。2週間後のカルグラヌリンCのレベルは、 $84 \pm 88\text{ng/ml}$ ($15 \sim 402$ の範囲)であった。完全に寛解したときに検出されるカルグラヌリンCのレベルは、 $83 \pm 84\text{ng/ml}$ ($6 \sim 371$ の範囲)であった。初期CRPレベルの平均値は、 $8.9 \pm 3.5\text{mg/dl}$ ($2.5 \sim 16.0\text{mg/dl}$ の範囲)であった。CRPレベルの平均値は、 γ グロブリンの治療の後、初期レベルに対し有意差を示すことなく $6.3 \pm 6.9\text{mg/dl}$ ($0.8 \sim 28.7\text{mg/dl}$)に減少した。CRPレベルの平均値は、2週間後において $1.5 \pm 2.1\text{mg/dl}$ ($0 \sim 8.9\text{mg/dl}$)であり、寛解時には 0.15mg/dl ($0 \sim 0.6\text{mg/dl}$ の範囲)であった。図3は、川崎病の過程における検出されたカルグラヌリンC及びCRPレベルを示す。

【0090】

16人の健常者コントロールにおけるカルグラヌリンCの平均値(平均年齢10.9; $3 \sim 17$ の範囲)は、 $50 \pm 32\text{ng/ml}$ であった。平均値を超えて標準偏差の2倍より高いレベルは異常値として、カットオフ値 115ng/ml を導く。2人の患者は、疾患の過程全部において通常範囲内のカルグラヌリンCレベルを有した。これらの患者は、冠動脈動脈瘤を患わない軽症の疾患並びに、5及び6日間の熱をそれぞれ有した。

【0091】

冠動脈動脈瘤を有する患者は、心臓合併症を患わない患者より高いカルグラヌリンC及びCRPの初期及び最大値レベルを有した。それゆえ、カルグラヌリンC濃度の差は、CRPの濃度差より大きかった(図4)。

【0092】

カルシウム結合タンパク質、カルグラヌリンCは、川崎病の強力なマーカーであり、91%の感受性を有するということを本研究は示す。血清レベルは、各患者における疾患活動性に関連した。カルグラヌリンCは、 γ グロブリン処理後すぐの後の治療に対する応答を測定することができる。カルグラヌリンCは、 γ グロブリンの治療前の川崎病を患う患者と治療後の患者との間の高い有意差を有する唯一のパラメーターである。さらに、カルグラヌリンCは、冠動脈病変の高い危険性の場合を同定する点ではCRPより優れている。それゆえ、カルグラヌリンCは、脈管炎及びおそらく他の自己免疫疾患のカスケードにおける急性炎症の初期指標である。

【0093】

特に上記の例は、本発明に従った治療及び/又はモニターのためのカルグラヌリンCの使用を示す。さらに、薬物療法は、モニター結果に従って変わりうる。

【0094】

例3：特に細菌性感染から区別することによる、全身発症若年性関節炎(SOJRA)の初期同定において有用なマーカーとしてのカルグラヌリンCの同定。

上記で詳細に記されたカルグラヌリンCのELISAを用いて、我々は、SOJRAを患う患者、若年性リュウマチ関節炎(JRA)の活動性オリゴ関節炎(Oligoarthritis)の形態を患う患者、細菌性感染(CRP-値 $> 50\text{mg/l}$; 平均CRP値: 95mg/l)を患う患者、及びコントロールのヒト($n=20$)において、カルグラヌリンCタンパク質の血清濃度を分析した。付け加えて、JRA患者の滑液におけるカルグラヌリンC濃度は、局所的炎症マーカーとしてカルグラヌリンCの

10

20

30

40

50

適用性を証明するために計測された。

【0095】

驚くべきことに、カルグラヌリンCの血清レベルは、SOJRA患者において劇的に上昇し、一方、JRA患者及び細菌感染を患う患者の両方において、中程度に上昇するだけであった(図5)ということが発見された：SOJRA患者におけるカルグラヌリンC濃度は、JRA患者及び細菌感染を患う患者に比較して、有意に約10倍高い。それゆえ、カルグラヌリンCは、SOJRAと細菌感染とを信頼して区別するための第1のマーカーである。

【0096】

カルグラヌリンC濃度とCRP濃度との比は、高い特異性及び感受性で(>80%)SOJRAを診断するための優れた及び信頼できる測定であるということを見つけた。

上記の例は、本発明に従った予防及び/又は治療のためのカルグラヌリンCの使用を、特に示す。

【0097】

例4：成功した初回治療の後で、若年性リウマチ関節炎(JRA)の再発危険性に対するマーカーとして、カルグラヌリンCの同定

メトトレキサート(MTX)での治療の終わりの時点での治療上の寛解において、患者の血清におけるカルグラヌリンC濃度が測定された。CRP及びESRも測定された。我々は、2つの群：群1：1年以内に疾患の再発。群2：1年以内の再発なし、つまり長い期間の寛解：の値を比較した。驚くべきことに、カルグラヌリンC血清濃度のみが、2つの群の間で有意に異なっており、それゆえ、予後の及び適切な治療に適している。ESRは、全く適していないことが分かった。CRPは、2つの例外を有して、調査した全ての患者(n=8)において陰性であり；それゆえ、感受性はとても不適切である。

【0098】

それゆえ、カルグラヌリンCは、JRA患者における疾患活性の同定、特に再発危険性の診断に対する第一のマーカーとして同定されうる。

【0099】

上記の例は、本発明に従った、予防、モニター、及び/又は治療へのカルグラヌリンCの使用を示す。

【0100】

例5：リウマチ性及び乾癬性の関節炎のマーカーとしてのカルグラヌリンCの同定患者及び健常者コントロール

我々は慢性炎症関節炎を患う42の患者を調査した。カルグラヌリンC濃度は、上記の通りサンドウィッチELISAを用いて、血清及び滑液において分析された。血清レベルは、乾癬性関節炎(平均疾患期間 14.6 ± 8.6 ヶ月)を患い、抗炎症薬MTX(平均投与量 12.9 ± 4.8 mg)で治療された14の患者(9人の男性、5人の女性；平均年齢40歳；21~64歳の範囲)から測定された。非ステロイド性抗炎症薬剤(NSAIDs)を除いて、別の薬物は処方されない。血清は、治療前及び治療後に取りれた(平均追跡調査間隔 6.4 ± 1.3 ヶ月)。付け加えて、血清及び滑液サンプルのペアは、関節鏡検査を受けた28人の患者(乾癬性関節炎をわずらう8人の患者、リウマチ性関節炎を患う9人の患者、血清陰性の関節炎を患い11人の患者)から入手された。全ての患者は、同じ医師によって試験された。患者の治療状態は、朝早くの硬直、痛みの点数、リッチー関節指数(Ritchie articular index)(RI)(Ritchie et al., 1968, QJ Med 37: 393-406)及び疼痛関節数(SJC)によって記述された。リウマチ性関節炎を患う患者は、血清陰性関節炎を患う患者より、有意に多くSJC及びRIに従った冒された関節を有する。血清陰性関節炎を患う患者は、これらの群の中である。診療状態に加えて、CRP、ESR、抗核抗体(ANA)、及びリウマチ性因子が、記述された。

【0101】

カルグラヌリンCの通常レベルは、炎症の兆候を有せず、さらにムエンスター大学病院又は我々の研究室のボランティアで、ルーチンな血液試験を行った15人の健常成人の血清において測定された。患者及びコントロールは、年齢又は性別において違いが無かった。患者及び健常者コントロールのデータは、表1において要約される。

【 0 1 0 2 】

【 表 1 】

表 1 : 乾癬性関節炎 (PsA) 、 リューマチ性関節炎 (RA) 、 及び血清陰性関節炎 (SA) 、 及び健常者コントロールをそれぞれ患う患者の特徴

	PsA	PsA (MTX群)	RA	SA	コントロール
患者 (No.)	8	14	9	11	15
男性/女性	5/3	9/5	5/4	6/5	10/5
年齢 (年)					
平均	43	40	53	33	32
範囲	28-67	21-64	28-72	18-45	19-43
活動性 (ポイント)					
RI	6.3±2.4	6.3±1.5	15.7±3.2*	2.2±0.6	n. d.
SJC	9.8±3.7	9.6±2.0	17.2±3.2*	1.9±0.6	n. d.
薬物療法					
NSAIDs (No.)	4	146		7	0
ステロイド (No.)	0	0	1	0	0
検査					
CRP (mg/dl)	5.2±2.3*	3.6±1.2	5.4±1.8*	2.3±0.7	n. d.
ESR (mm/h)	37±12*	28±9	49±8*	25±5	4±1
ANA* (No.)	0	2	5	4	n. d.

RI=リッチー関節指数; SJC=疼痛関節数; SF=滑液; n. d. =決定されない: データは、
 平均値±SEMで表された。他に特記の場合を除く; *P<0.05

【 0 1 0 3 】

統計分析

マン-ホイットニーのU検定 (通常分布でない独立値に対し) 及びウィルコクソン検定 (対応値に対し) が、異なる分類間における有意差を決定するために行われた。ウィンドウズ (登録商標) 用バージョン9.0のSPSSは、カルグラヌリンCと別のパラメーターとの相関を決定するために使われた。データは、平均値±SEMとして表される。0.05より大きいP値は、有意差が無いとした。

【 0 1 0 4 】

血清及び滑液におけるカルグラヌリンCの分析結果

カルグラヌリンC血清レベルは、健常者のコントロール (60±20ng/ml) と比較して、リ
 ーマチ性関節炎において最も高く (平均値340±90ng/ml)、乾癬性関節炎において目立って
 上昇し (平均値260±60ng/ml)、そして血清陰性関節炎において少ないが、それでも有意に
 上昇した (190±20ng/ml)。血清及び滑液のサンプルのペアにおいて、我々は、全ての患者
 において、血清におけるよりも5~10倍高いカルグラヌリンCレベルを滑液において見つけ
 た。滑液のカルグラヌリンCレベルは、リューマチ性関節炎及び乾癬性関節炎 (1,870±1,1
 60ng/ml 及び1,720±425ng/ml、それぞれ) におけるより、血清陰性関節炎 (4,920±1,680ng
 /ml) において高い。カルグラヌリンCの血清濃度は、疾患の活動度を決定するために使わ
 れる別のパラメーターに相関し、特にESR (r=0.47; P<0.01) 及びRI (r=0.36; P<0.01) に
 最も有意に相関した。データは図6に要約される。

【 0 1 0 5 】

ここで、カルグラヌリンCの血清レベルは、関節炎の異なる形態における局所的疾患活性の有用なマーカーである。

【0106】

滑液組織におけるカルグラヌリンCの局所的発現

炎症部位におけるカルグラヌリンCの局所的な発現を確かめるため、我々は、免疫組織化学的研究を行った。滑膜生検は、MTX-治療の前及び後における乾癬性関節炎を患う4人の患者において、行われた。付け加えて、生検は、MTXを受けていない乾癬性関節炎を患う5人の患者から取られ、リウマチ性関節炎を患う2人の患者、及び血清陰性関節炎を患う2人の患者から取られた。滑膜炎を患っていない2人の患者の生検は、ネガティブコントロールとして役に立った。凍結固定された及びパラフィン包埋された切片は、当該技術分野によく知られている通りに準備された。ウサギ抗-ヒト・カルグラヌリンC抗体は、カルグラヌリンCの発現を検出するために使われた。マウス-抗-ヒト・CD15、顆粒球関連抗原は、浸潤している顆粒球を検出するために使われた。マウス-抗ヒト・CD163抗体(RM3/1のクローン、マクロファージ特異的スカベンジャー受容体を検出する)は、浸潤しているマクロファージを検出するために使われうる。種に適合する不適切な特異性のコントロール抗体は、ネガティブコントロールとして使われた。最終的に、切片は、メイヤーのヘマトキシリンで対比染色された。2次抗体及び色反応の基質は、以前に記述されたとおりに使われた。2重標識実験のために、抗カルグラヌリンC抗体に続き、抗CD15抗体が使われた。我々は、アフィニティーで精製された、テキサスレッド又はFITCが結合したヤギ-抗-マウス又はヤギ-抗ウサギ-2次抗体(Dianova, Hamburg, Germany)を用いた。蛍光は、ウィンドウズ(登録商標)用Axiovision3.0(Zeiss, Goettingen, Germany)を供給されるZeiss Axioskopが結合するAxioCam Cameraを用いて分析された。特異抗体を取り除いた後の、又は特異抗体を不適切な特異性を持つアイソタイプ適合性コントロール抗体に置換えた後のコントロール実験において、相互反応性又は溢流は検出されなかった。

10

20

30

40

【0107】

結果は、図7に示される。カルグラヌリンCは、関節炎を患っていないコントロールの滑膜組織において見つからなかった。我々は、リウマチ性関節炎、血清陰性関節炎、及び乾癬性関節炎を患う患者の炎症性滑膜組織においてカルグラヌリンCの発現を見つけた。リウマチ性関節炎及び血清陰性関節炎では、我々は、浸潤している及びライニング層におけるカルグラヌリンC陽性細胞を見つけた。炎症に関連するカルグラヌリンCの拡散した染色が有り、浸潤顆粒球によって分泌された後の細胞外カルグラヌリンCを指している。小血管とカルグラヌリンCの発現との強い関連を有するリウマチ性関節炎及び血管陰性関節炎と比較して、乾癬性関節炎におけるカルグラヌリンCの発現パターンは異なった。カルグラヌリンCは、滑膜血管の内皮及び浸潤の血管周囲に接着する顆粒球によって発現された。カルグラヌリンCは、乾癬性関節炎においても炎症性滑膜における内皮の細胞により放出されているようである。CD15との共染色は、顆粒球が主にカルグラヌリンCを発現したということを明らかにした。我々は、免疫蛍光顕微鏡を用いて、2重標識の実験において、カルグラヌリンCとCD15の共発現を証明した。CD163を染色することは、明らかに、炎症性滑膜組織において細胞の大部分に寄与する、マクロファージの異なるパターンを明らかにした。

【0108】

異なる関節炎の形態のヒト滑膜組織を最初に分析することにおいて、我々は、リウマチ性関節炎及び血清陰性関節炎と比較して、乾癬性関節炎におけるカルグラヌリンCの分布は明らかに異なるということを発見した。我々は、血管周囲の目立ったカルグラヌリンCの異なる分布を見つけた。PsAにおける血管周囲の発現パターンは、この形態の関節炎に関する血管新生の際におけるカルグラヌリンCのある役割を指摘する。

【0109】

治療に反応する疾患活動性と、カルグラヌリンCとの相関

我々は、乾癬性関節炎を患う14人の患者の血清における、及び4人の患者滑膜におけるカルグラヌリンCの発現に関してMTX治療の効果を分析した。MTX治療の前、過度のカルグ

50

ラヌリンCの発現は、乾癬性関節炎患者の滑膜組織において、上記で示したようにサブライニング層及び血管周囲において見つかった。カルグラヌリンC発現は、効果的なMTX治療後の同じ患者の滑膜生検においてほとんど検出できない。評価は表2に示される。

【 0 1 1 0 】

【 表 2 】

表 2 : 滑膜組織において発現するカルグラヌリンCの免疫組織化学的分析

	MTX治療前	MTX治療後
患者 1	23	3
患者 2	12	<1
患者 3	17	<1
患者 4	21	<1

滑膜は、MTX治療開始の前及び後において4の患者から取られた。全ての切片は、400倍の拡大でランダムに選ばれた場所におけるカルグラヌリンC-陽性細胞の数を調べられた。少なくとも、切片につき10の場所が分析された。10の場所の平均の値が、計算された。

【 0 1 1 1 】

全ての患者は、RI、痛み点数、SJC、及び早朝の硬直に従った治療の点数を有意に改良した。CRP及びESRレベルも減少した。治療への反応は、MTX治療後におけるカルグラヌリンCの血清レベルの目立った減少に匹敵した(MTX前、平均値240ng/ml vs. MTX後、100ng/ml、図8)。カルグラヌリンCレベルは、EMS、痛み点数、RI及びSJCの改良に相関する。

【 0 1 1 2 】

【 表 3 】

表 3 : 乾癬性関節炎を患いMTX治療の開始後の患者における疾患活動性の改善

	MTX前	MTX後
EMS (分)	76	25**
痛み (ポイント)	5.3	3.2*
RI (ポイント)	6.3	1.9**
SJC (No.)	9.6	3.3**
ESR (mm/h)	28	12*
CRP (mg/dl)	4.2	2.5*

*p<0.05 ; **p<0.01

【 0 1 1 3 】

本研究は、リウマチ性関節炎、血清陰性関節炎、及び特に乾癬性関節炎における滑膜炎の病原における、ヒト・カルグラヌリンCの役割を始めて示す。滑液及び血清におけるカルグラヌリンCの分析は、本タンパク質が滑膜における炎症の局所的部位で発現され及び分泌されるということを示す。炎症におけるカルグラヌリンCに基づくデータは、マウスのシステムでのみ公表されてきているだけである(Hofmann et al., 1999, Cell 97:889-901; Schmidt et al., 2001, J Clin Invest 108:949-955)。

【0114】

本研究は、滑膜組織において、局所的カルグラヌリンCの発現上昇を示して、慢性的に活動性の関節炎を患う患者の血清及び滑液における濃度の上昇をもたらした最初の研究である。MTX-治療の開始前及び後の乾癬性関節炎を患う患者の滑膜組織の分析は、カルグラヌリンCの発現と、カルグラヌリンCの血清濃度の減少によって反映される疾患の活動性の改良との強い相関を表した。

【0115】

カルグラヌリンCの血清レベルは、関節炎の異なる形態における局所的疾患の活動性の有用なマーカーであるということを示す。活動性の関節炎を患う患者は、健常者のコントロールより有意に高いカルグラヌリンCのレベルを示した。我々は、患者の滑液における約10倍高いカルグラヌリンCの濃度を見つけた。炎症部位においてカルグラヌリンCの高い局所的な発現は、血清において検出される相関レベルの原因となるように思える。この脈絡では、血清陰性関節炎を患う患者の血清に比べ、滑液における高いレベルは、冒された関節が少数であることと相関する。乾癬性関節炎および特にリウマチ性関節炎では、カルグラヌリンCの分泌を伴う多くの炎症性関節は、血清中に見られるカルグラヌリンCの高い濃度をもたらしているようである。乾癬性関節炎においては、カルグラヌリンCのレベルは、MTXでの成功した免疫抑制性の治療を反映した。カルグラヌリンCは、血清及び滑液におけるMTX治療効果の信頼できるマーカーであった。乾癬性関節炎患者の滑膜におけるカルグラヌリンCの発現に関する目立ったMTXの効果は、好中球を活性化させかつカルグラヌリンC発現を引き起こす炎症誘発性サイトカインの減少が原因でありうる(Dolhain et al., 1998, Br J Rheumatol 37: 502-508)。他方、好中球が滑膜組織へ移動することを阻害しうる、好中球の走化性に関するMTXの直接的効果がありうる。

10

20

【0116】

ヒト関節炎におけるカルグラヌリンCの発現は、このタンパク質、及びタンパク質のRAGEとの相互作用が、新規の治療の標的であるかという疑問を誘起する。関節炎を含む炎症の異なるマウスのモデルでは、可溶性RAGE(sRAGE)とのこの相互作用を阻害すること及び抗カルグラヌリンC抗体は、明白な抗炎症性効果を示した(Hofmann et al., 1999, Cell 97: 889-891; Schmidt et al., 2001, J Clin Invest 108: 949-955)。マウスの炎症モデルにおける阻害剤の有利な効果と合わせて、ヒト関節炎におけるカルグラヌリンCの機能的役割の証拠は、このタンパク質を、ヒト・カルグラヌリンCの炎症誘発性活性に注目した新しい生物学的治療の開発に対し魅力あるものにする。

30

【0117】

本例は、血清カルグラヌリンCが、リウマチ性及び乾癬性関節炎の治療の成功を(計測することで)モニターすることを可能にする、感受性の高いマーカーとして適しているということを示す。

【0118】

特に、本発明に従った、モニター及び/又は治療のためのカルグラヌリンCの使用を上記の例は示した。

【0119】

例6: 炎症性腸疾患における疾患の段階を決定するためのマーカーとしてのカルグラヌリンCの使用

40

患者及び健常者のコントロール

クローン病患者(n=40)、潰瘍性大腸炎患者(n=34)及び健常者のコントロール(n=30)が調査された。カルグラヌリンCタンパク質の血清レベルは、ELISAを用いて上記のとおり計測された。平行してCRP及びESRも測定された。クローン病の疾患活動性は、クローン病活動性指標を用いて記され、潰瘍性大腸炎では、大腸炎活動性指標(CAI; Rachmilewitz, 1989, Br Med J 298: 82-86)及びTruelove及びWittsの判断基準(1955, Br Med J 2: 1041-1048)を用いることで記された。患者のデータは、表4に要約される。

【0120】

【表 4】

表 4：炎症性腸疾患を患う患者の特徴

	クローン病	潰瘍性大腸炎
患者数	40	34
女性／男性	28/12	10/24
年齢（年）		
平均	32	33
範囲	18-56	19-60
疾患活動性*		
活動	30	15
非活動	10	19
薬物療法		
ステロイド	23	21
5-ASA又はスルファサラジン	36	33
アザチオプリン	8	8
インフリキシマブ	3	0
治療なし	0	1

* CDにおけるCDAI及びUCIにおけるCAIをそれぞれ用いた疾患の評価。
活動性疾患はCDAI>150又はCAI=4として決定された。

【 0 1 2 1 】

付け加えて、我々の患者の10人(6人はクローン病、4人は潰瘍性大腸炎を患う)は、8ヶ月(3～12の範囲で)の期間追跡調査して、カルグラヌリンC血清レベルと、疾患活動性の各コースとの相関を決定した。

【 0 1 2 2 】

マンスター大学病院又は我々の研究室のボランティアで、ルーチンな血液検査を受けた健常者のコントロール(14人は男性、16人は女性；平均年齢は34歳；19～57歳の範囲)は、炎症の兆候を有しない。コントロールと患者との間で、年齢又は性別の有意差は無かった。

【 0 1 2 3 】

統計分析

マンホイットニーのU検定は、異なる分類間のカルグラヌリンC及びCRPの発現の有意差を決定するために行われた。血清マーカーと疾患活性との間の相関は、ウィンドウズ（登録商標）用のSPSSバージョン9.0のソフトウェアを用いることによって、パーソン検定で分析された。データは、平均値±95%の信頼区間として表された。0.05より大きいP値は、有意差が無いとした。

【 0 1 2 4 】

カルグラヌリンC血清分析の結果

クローン病患者(CDAI > 150、n = 30)は、健常者のコントロール($470 \pm 125\text{ng/ml}$ vs. $75 \pm 15\text{ng/ml}$; $P > 0.001$)と比較して有意に上昇したレベルを有した。非活動性の疾患と比較して、活動性クローン病を患う患者におけるカルグラヌリンC血清レベルとの間の有意差があった($470 \pm 125\text{ng/ml}$ vs. $215 \pm 95\text{ng/ml}$; $P > 0.01$)。非活動性の疾患を患う患者でさえ、健常者のコントロールと有意に異なる血清レベルを示した。($215 \pm 95\text{ng/ml}$ vs. $75 \pm 15\text{ng/ml}$; $P > 0.05$)。それゆえ、疾患活動性は、正確にモニターされうる。それ以上に

、カルグラヌリンCのレベルは、CDAIと強く相関しており、疾患の段階を診断するための優れた適切性を支持する。

【0125】

活動性慢性潰瘍性大腸炎(CAI ≥ 4 ; /n = 15)を患う患者では、カルグラヌリンCのレベルは、健常者コントロールと比較すると有意に上昇した($400 \pm 120\text{ng/ml}$ vs. $75 \pm 15\text{ng/ml}$; $P < 0.001$)。活動性潰瘍性大腸炎と非活動性潰瘍性大腸炎との間における血清レベルの差は、クローン病においてより強調された($400 \pm 120\text{ng/ml}$ vs. $115 \pm 55\text{ng/ml}$; $P < 0.001$)。クローン病とは対照的に、非活動性の潰瘍性大腸炎を患う患者は、健常者のコントロールと匹敵する血清レベルを有した。それ以上に、カルグラヌリンCのレベルは、Truelove及びWitt's指標によって決定されるとき、疾患活動性と強く相関し、疾患の段階を診断するための優れた適合性を支持した。このように、カルグラヌリンCは、慢性炎症性腸疾患、特にクローン病及び潰瘍性大腸炎の疾患段階の強力な血清マーカーである。

【0126】

CRPレベルは、非活動性の疾患に比較して、活動性のクローン病を患う患者においてより高かった($2.0 \pm 1.0\text{ng/ml}$ vs. $0.3 \pm 0.3\text{ng/ml}$; $P < 0.05$)。非活動性の疾患を患う患者と比較して、活動性の潰瘍性大腸炎を患う患者でCRPレベルの有意差はなかった($1.1 \pm 0.9\text{mg/dl}$ vs. $0.4 \pm 0.3\text{mg/dl}$)。ESRは、活動性クローン病を患う患者において有意に高かった($22 \pm 7\text{mm/h}$ vs. $9 \pm 4\text{mm/h}$; $P < 0.01$)。しかしながら、ESRは、潰瘍性大腸炎患者の群のあいだで有意に異ならなかった($10 \pm 5\text{mm/h}$ vs. $12 \pm 5\text{mm/h}$)。データは図9に要約される。

【0127】

我々は、さらにカルグラヌリンC血清レベルが、クローン病($r = 0.52$, $n = 40$, $P < 0.01$)並びに潰瘍性大腸炎($r = 0.70$, $n = 34$, $P < 0.001$)における疾患活動性と相関することを示すことができた(cf. 下の表5)。CRPレベルは、非活動性の疾患を患う患者に比較して、活動性クローン病を患う患者において高かったが、有意水準は低かった(2.0mg/dl vs. 0.3mg/dl ; $P < 0.05$)。興味深いことに、クローン病のみにおいて、疾患活動性とCRP及びESRとの相関があり、一方これらのマーカーと疾患活動性との相関は潰瘍性大腸炎では見つけることができなかった。炎症性腸疾患の古典的なマーカーの正確性に疑問があることは、以前のレポートと一致する(Nielsen et al., 2000, Am J Gastroenterol 95:359-367; Niederau et al., 1997, Hepatogastroenterology 44: 90-107)。

【0128】

【表5】

表5：カルグラヌリンC、CRP、及びESRと炎症性腸疾患における疾患活動性との相関

	カルグラヌリンC	CRP	ESR
CDにおけるCDAI	$r=0.52$ (n=40)	$r=0.44$ (n=25)	$r=0.32$ (n=28)
p	<0.01	<0.01	<0.05
UCにおけるCAI	$r=0.70$ (n=34)	$r=0.35$ (n=26)	$r=-0.1$ (n=25)
p	<0.001	n. s.	n. s.

n. s. =有意差なし

【0129】

炎症性腸疾患を患う10人の患者(6人がクローン病であり、4人が潰瘍性大腸炎を患う)におけるカルグラヌリンC血清レベルの8ヶ月の期間(3~12の範囲)における個々の追跡調査のデータは、疾患活動性との強い相関を示した。潰瘍性大腸炎を患う患者において、個々の追跡調査データは、カルグラヌリンCレベルは、炎症の確立されたマーカー、例えばESR

よりも、よく疾患の活動性と相関した(図10)。カルグラヌリンC血清レベルは、インフリキシマブでの治療後速やかに減少した(図11)。

【0130】

免疫組織化学/免疫蛍光顕微鏡

活動性クローン病又は活動性潰瘍性大腸炎を患う患者及び腸炎症を有しないコントロールからの腸生検のパラフィン包埋及び凍結した切片は、ウサギ抗 - カルグラヌリンC抗体によりカルグラヌリンCの発現を検出するために使われた。疾患活動性は、ヘマトキシリン及びエオシン染色された切片において決定された。モノクローナルマウス抗ヒト顆粒球関連抗原CD15抗体(Dako, Hamburg, Germany)、感受性の高い好中球マーカーは、浸潤している好中球を検出するために使われた。連続切片の染色は、浸潤におけるカルグラヌリンC及びCD15の共発現を検出するために行われた。コントロールとして、不適切な特異性のモノクローナルマウスIgM(Dianova, Hamburg, Germany)及びポリクローナルウサギIgG(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)が用いられた。2次抗体及び呈色反応の基質は、以前記述されたとおり(Rammes et al., 1997, J Biol Chem 272: 9496-9502; Frosch et al., 2000, Arthritis Rheum 43: 628-637)に行った。免疫蛍光顕微鏡は、上記例5のとおりに行われた。

【0131】

炎症性腸疾患を患う患者からの組織の免疫組織化学研究は、炎症部位において浸潤細胞によってカルグラヌリンCの発現の特異的パターンを示し、一方染色が、非活動性疾患を患う患者からの組織において見つけられなかった。付け加えて、カルグラヌリンCは、カルグラヌリンC陽性細胞を取り囲む細胞外分布において見つかった。カルグラヌリンCの分泌を反映し、かつ浸潤において別の受容体を有する細胞におそらく結合する。活動性クローン病を患う患者からの組織において、カルグラヌリンCは、肉芽腫性病変の周囲で検出された(図12A,B)。潰瘍性大腸炎において、腺窩膿瘍は、大部分は、カルグラヌリンC陽性細胞を含んだ(図12D)。内皮からルーメンへ移動する細胞もまた、クローン病並びに潰瘍性大腸炎においてカルグラヌリンC陽性のように見えた。モノクローナル抗 - CD15での共染色は、カルグラヌリンCの発現が、炎症組織に浸潤した好中球に限られたという証拠を提供した(図12H)。

【0132】

まとめると、我々のデータは、カルグラヌリンCが、炎症性腸疾患の間における主な役割を担う炎症誘発性タンパク質であるということを示す。カルグラヌリンCは、活動性クローン病及び潰瘍性大腸炎を患う患者の炎症性組織において強く発現し、そしてカルグラヌリンCの循環レベルは、疾患活動性をモニターする際の信頼できる炎症マーカーであるようである。それ以上に、マウスの大腸炎モデルにおいて、阻害剤の有利な効果は、カルグラヌリンCを、炎症性腸疾患を患う患者における新規治療のアプローチの魅力ある標的とした。

【0133】

上記の例は、本発明にしたがったモニター、予防、及び/又は治療のためにカルグラヌリンCを使用することを示す。

【0134】

例7：カルグラヌリンCは、初回の成功した治療後の若年性リウマチ性関節炎(JRA)における最小の残存の疾患活動性マーカーとして有用である。

血清中のカルグラヌリンCの濃度は、少数関節性および多発関節性若年性リウマチ性関節炎を患う13人の患者であって、寛解を導くためにMTXで治療を受けた患者において測定された。そして、データは、再発危険性との相関を遡及的に調査された。カルグラヌリンC濃度は、JRA判断基準に従って寛解が記述されたときにおいて測定された。カルグラヌリンC濃度の測定は、上記のとおりにELISAを用いて行われた。

【0135】

MTX治療が中断されたとき、12ヶ月以上の間安定寛解状態であった6人の患者は、12ヶ月が経過する前に再発した7人の患者より、有意に低いレベル(65 vs. 135ng/mlカルグラヌ

リンC; $P < 0.05$; cf. 図13)であることが分かった。対照的に、ESR及びCRP分析は、これらの患者において違いを示さず、再発危険性を予測するために適切ではなかった。このように、カルグラヌリンCは、進行中炎症の別の研究上又は治療上の兆候が無い状態においてでさえ、残存の炎症性疾患活性を示す。カルグラヌリンCは、このように安定な寛解に対する予測的マーカーであり、適切な診断及び治療を可能にする。再発の危険性が低いと診断された患者は、重度の副作用を示すMTXを受ける必要が無く、一方再発の危険性が高い患者は、更なるMTX治療を、適切な薬物療法として与えられるだろう。

【0136】

例8: カルグラヌリンCは、*in vitro*において、活性化好中球におより分泌される。

潰瘍性大腸炎並びにクローン病において観察される最も目立った組織学的特徴の一つは、炎症の早い時間点において、好中球が炎症性粘膜への浸潤することである(Nikolaus et al., 1998, Gut 42: 470-476; Kucharzik et al., 2001, Am J Pathol 159: 2001-2009)。最近、カルグラヌリンCは、活性化ヒト好中球から分泌されるということが示されてきた(Boussac & Garin, 2000, Electrophoresis 21: 655-672)。

【0137】

TNF α と好中球由来のカルグラヌリンCとの間の関係をさらに証明するために、我々は、TNF α が、好中球の周辺においてカルグラヌリンCの分泌を刺激することができることを示すことができた。ヒトの混合ドナー好中球は、以前記述されたとおり(Vogl et al., 1999, J Biol Chem 274: 25291-25296)に、パフィーコート(German red cross, Munster, Germany)から単離された。簡潔に説明すると、Ficoll-Hypaque(Biocoll, Biochrom, Berlin, Germany)を通した遠心は、単核細胞及び血小板から好中球を分離するために行われた。赤血球は、デキストラン遠心沈降によって分離された。残りの細胞は、PBSで2回現れてた。細胞の純度は、トリパンブルー染色性細胞の形態学的分析によって測定されたとき、約95%以上であった。好中球は、終濃度 1×10^7 細胞/mlで、1%グルタミン、1%非必須アミノ酸、及び1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した無血清RPMI培地(Biochrom, Berlin, Germany)に再懸濁された。TNF α (組換えヒトTNF α 、Cell Biology Mannheim, Germany)を終濃度2又は5ng/mlまで添加することによって、分泌は、即座に引き起こされた。刺激された及び刺激されていない細胞は、37℃で、15又は30分間それぞれインキュベーションされた。最後に、好中球は、4℃、500×gで5分間でペレットにされ、上清はサンドウィッチ-ELISAでのカルグラヌリンCの分析用に保存された。細胞溶解は、乳酸脱水素酵素のNADHをNAD $^{+}$ に変換する能力を用いて、及びNADHの340nmでの吸収の減少を計測することによって乳酸脱水素酵素の活性を分析することにより、評価された。タンパク質分解酵素阻害剤は、タンパク質分解酵素による分解を阻止するために添加された。

【0138】

カルグラヌリンCの最小基底分泌は、刺激されていない好中球において検出された。細胞の上清におけるカルグラヌリンCの濃度は、3回の独立した実験において、5と10ng/mlとの間であった。TNF α で刺激された後、カルグラヌリンCの分泌の時間-及び用量-依存性の増加があった。LDH活性によって試験されたとき、我々の実験の間では生存度と細胞溶解とに差が無かった。

【0139】

好中球由来のタンパク質カルグラヌリンCの有意に高い増加は、炎症、例えば腸炎症の間における好中球の重要な役割を目立たせる。好中球は、とても早いエフェクター細胞群に属しており、この群は、粘膜及び腸の内皮細胞に浸潤し、それにより炎症性腸疾患の間、腸管障壁機能を変化させる。上昇した循環レベルの血清カルグラヌリンCは、好中球が局所的免疫システムの内においてのみ役割を果たすのではなく、慢性活動性炎症性腸疾患の間、全身性免疫応答においても重要である。

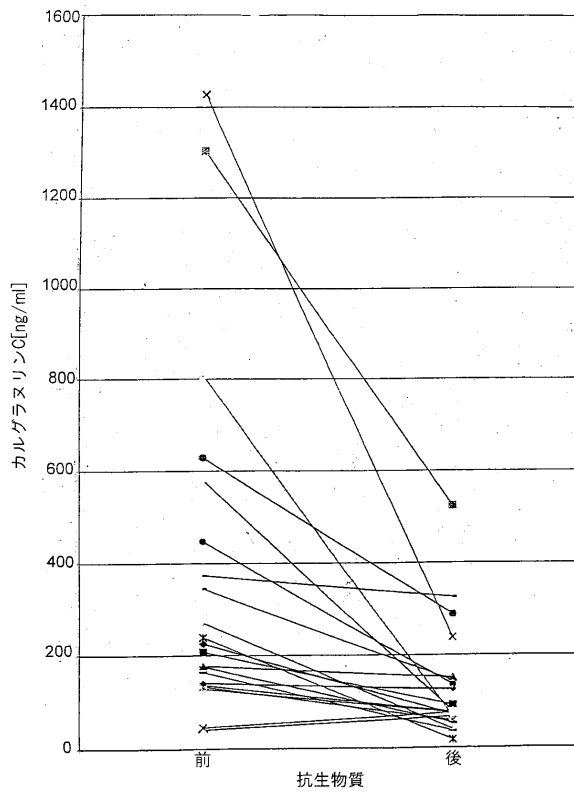
【0140】

ここで、TNF α が、好中球周辺におけるカルグラヌリンCの分泌を刺激することができるということが示される。TNF α は、血清においてほとんど検出できず、かつカルグラヌリンCは、室温で、又は数回の凍結融解の後でさえ、極端に安定なタンパク質であり、血清

カルグラヌリンCの分析は、抗TNF α 治療に対する応答を評価するためのよいマーカーを提供しうる。

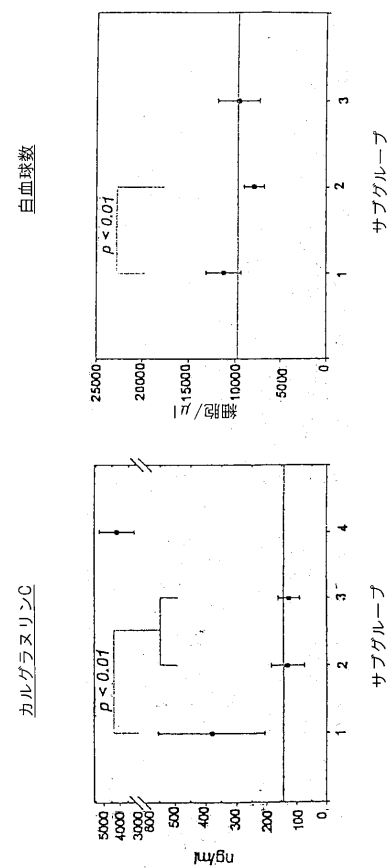
【図 1】

図1



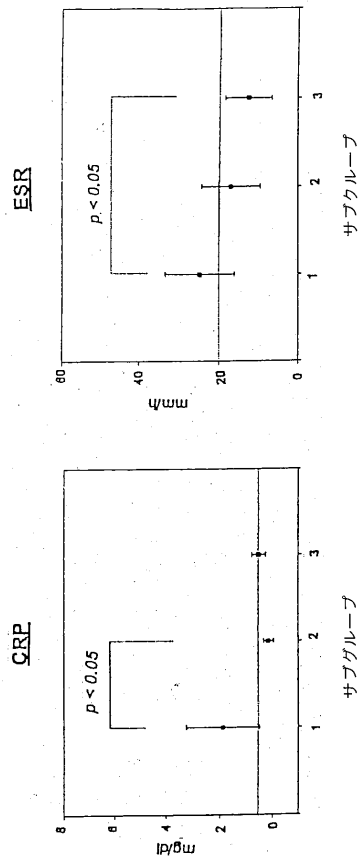
【図 2 A】

図2A



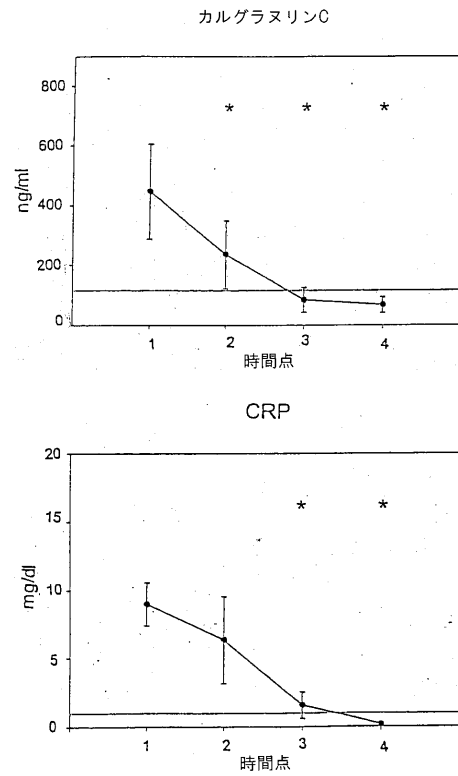
【図2B】

図2B



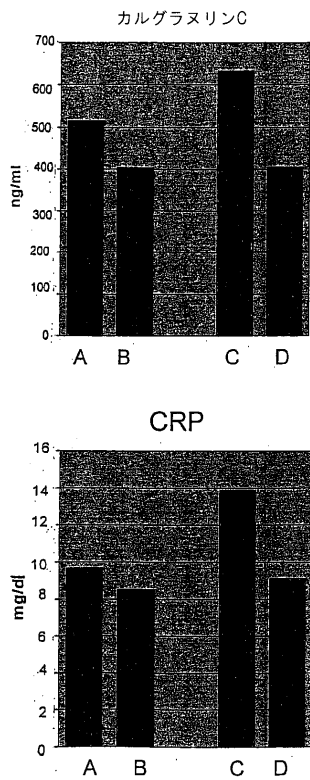
【図3】

図3



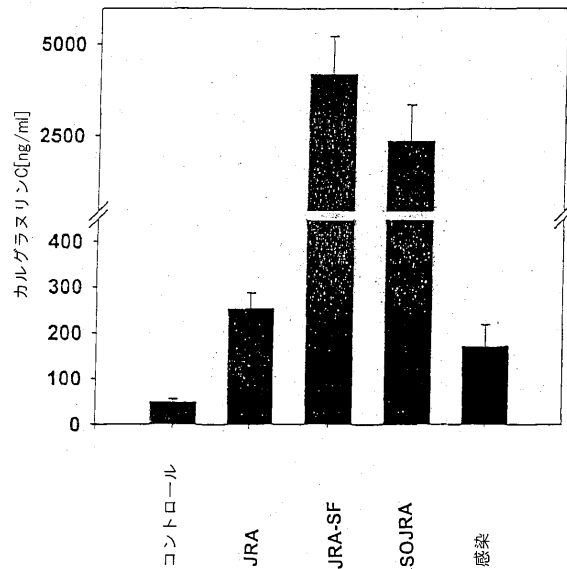
【図4】

図4



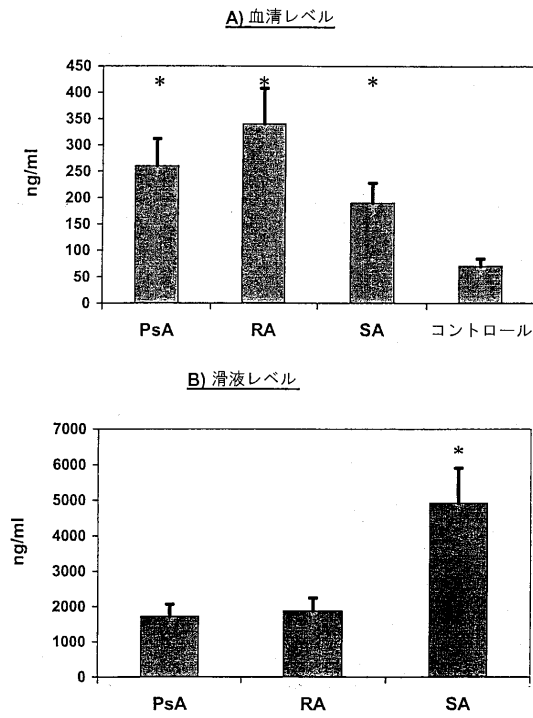
【図5】

図5



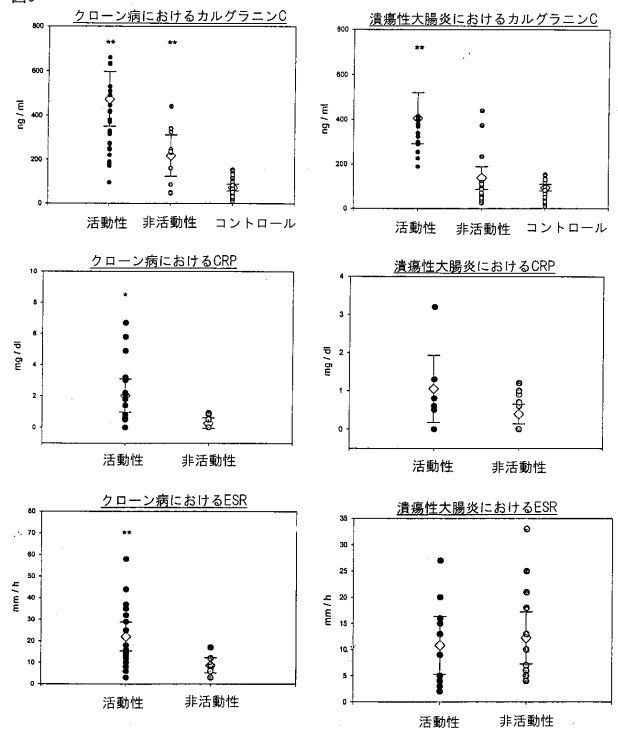
【図6】

図6



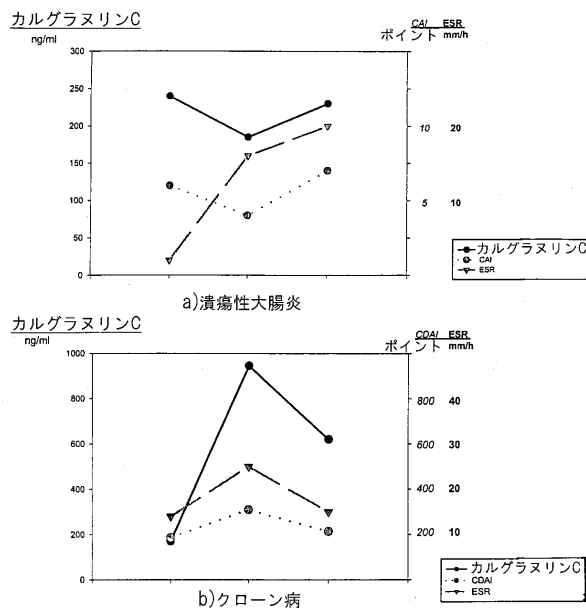
【図9】

図9



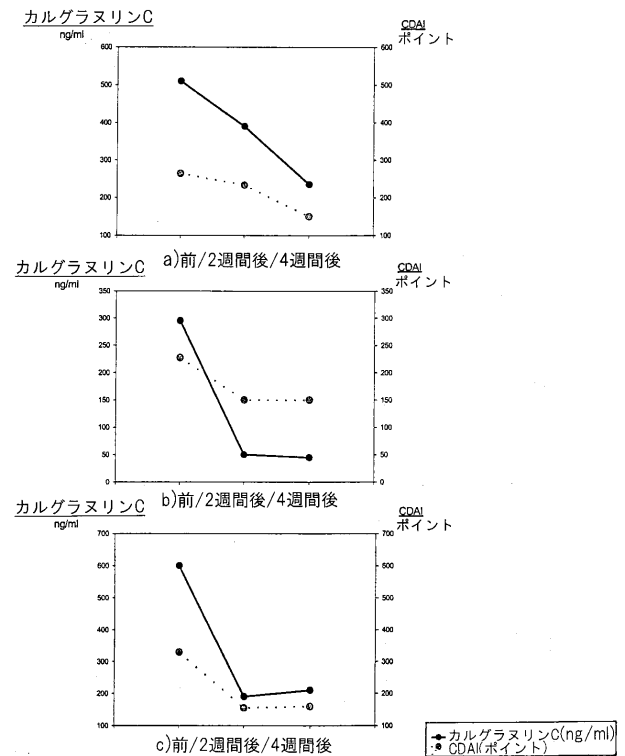
【図10】

図10



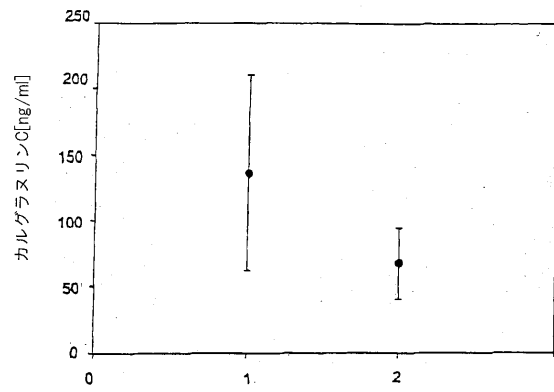
【図11】

図11



【図 13】

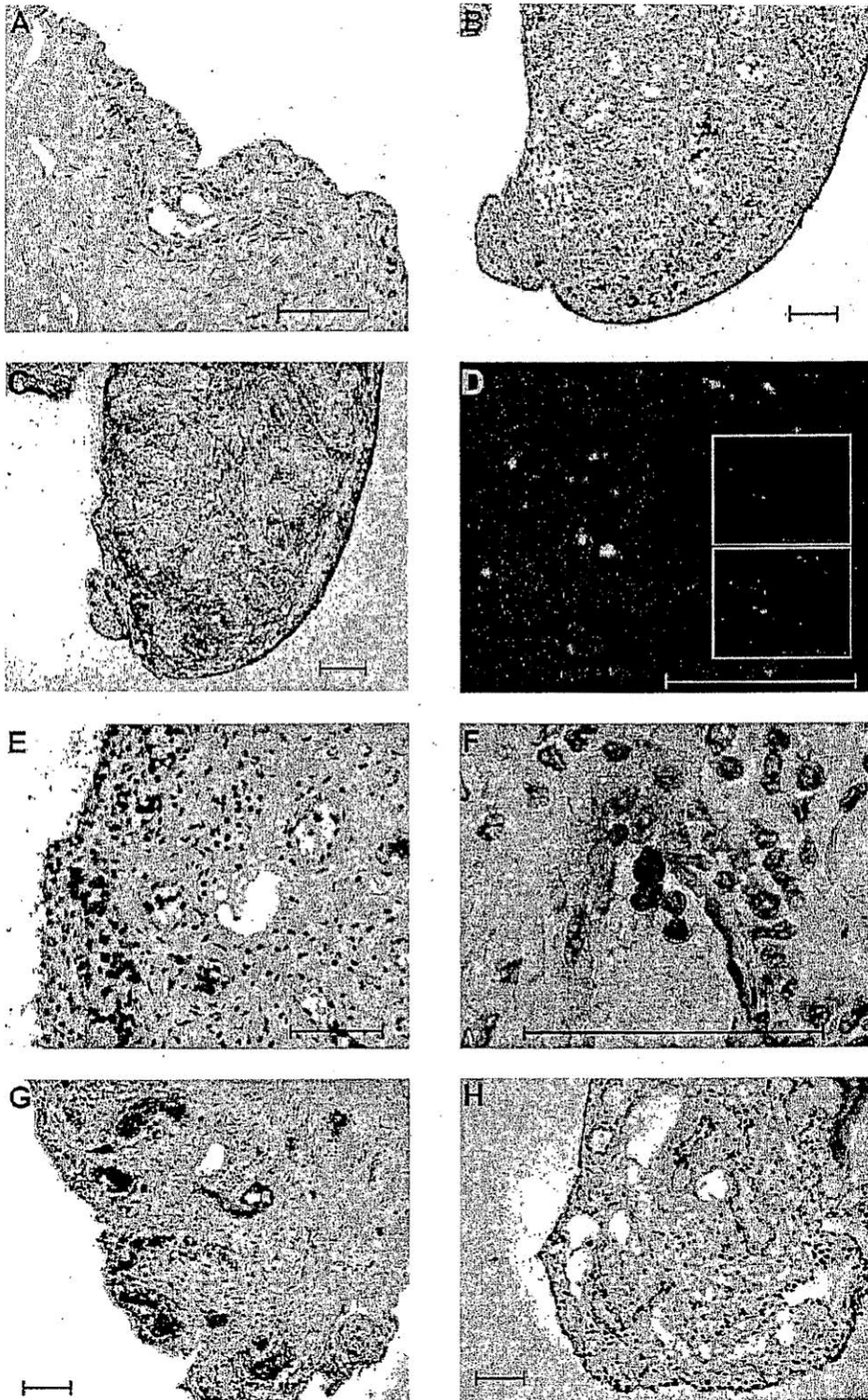
図13



1=1～12ヶ月間の寛解を有する患者(n=7)
2=12ヶ月以上の寛解を有する患者(n=6)

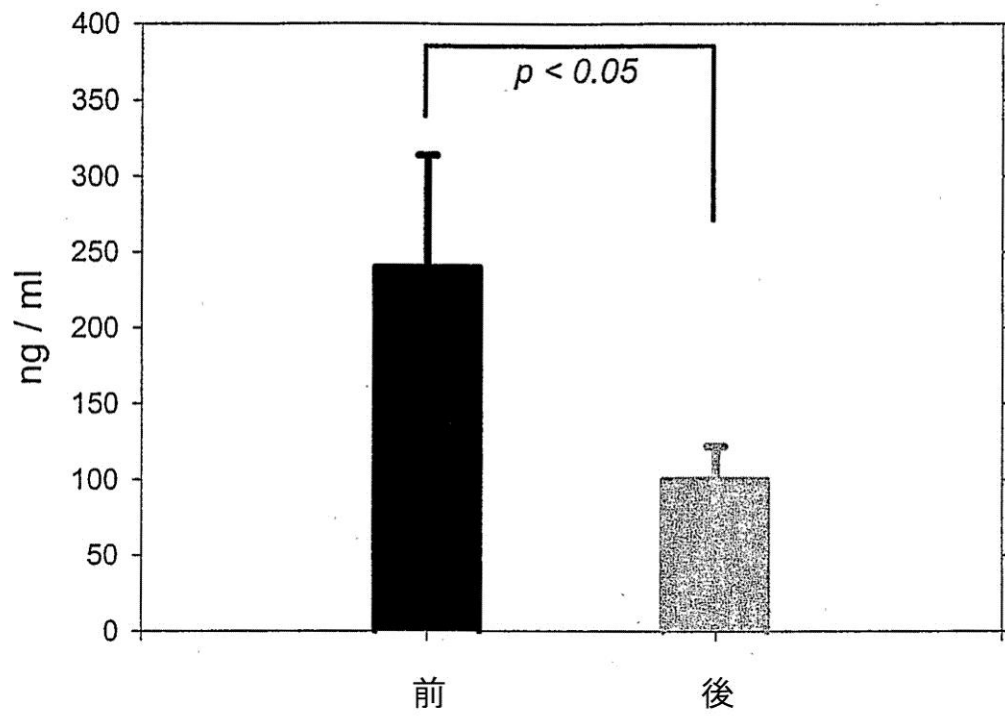
【図7】

図7



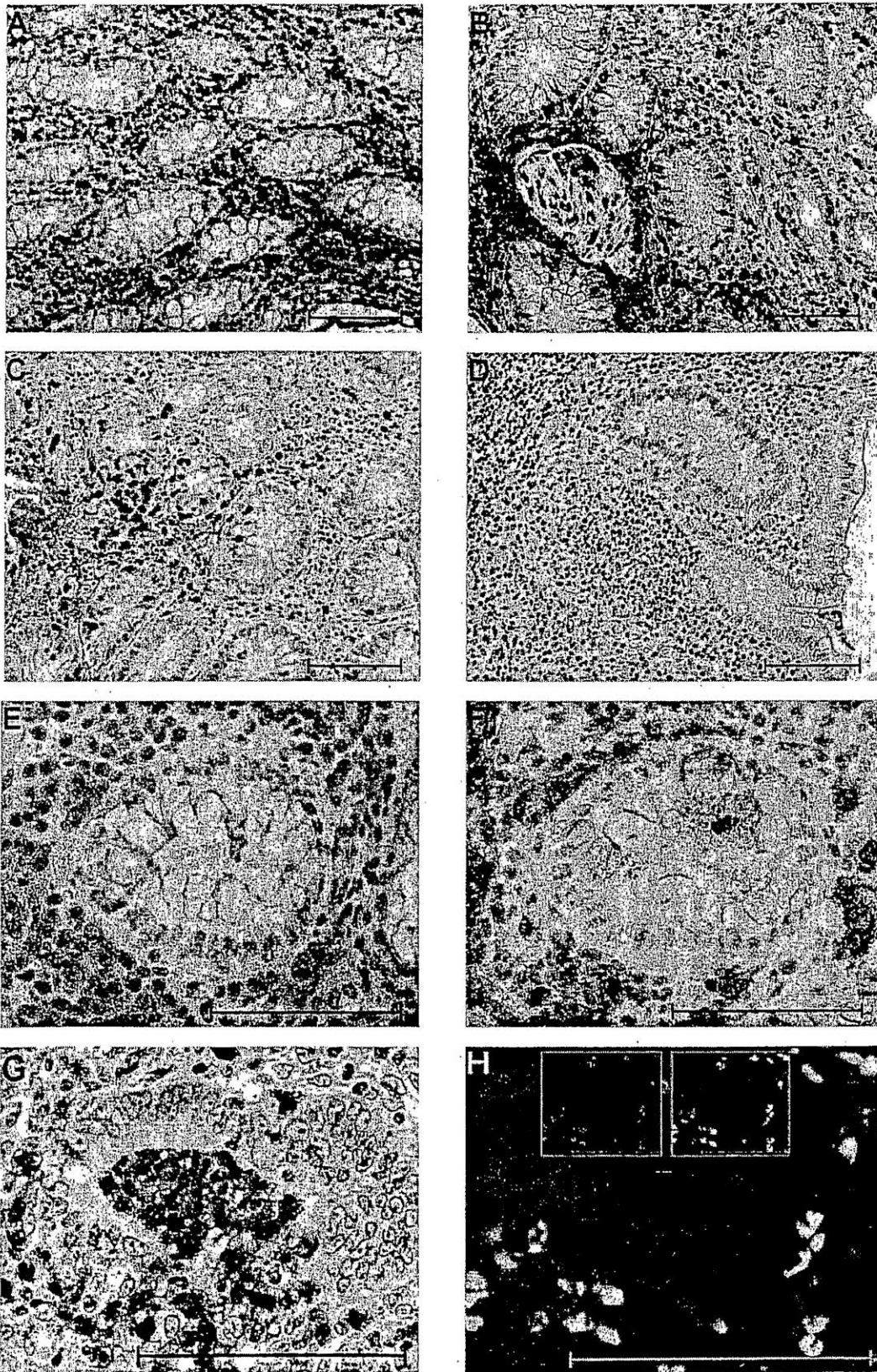
【 図 8 】

図8



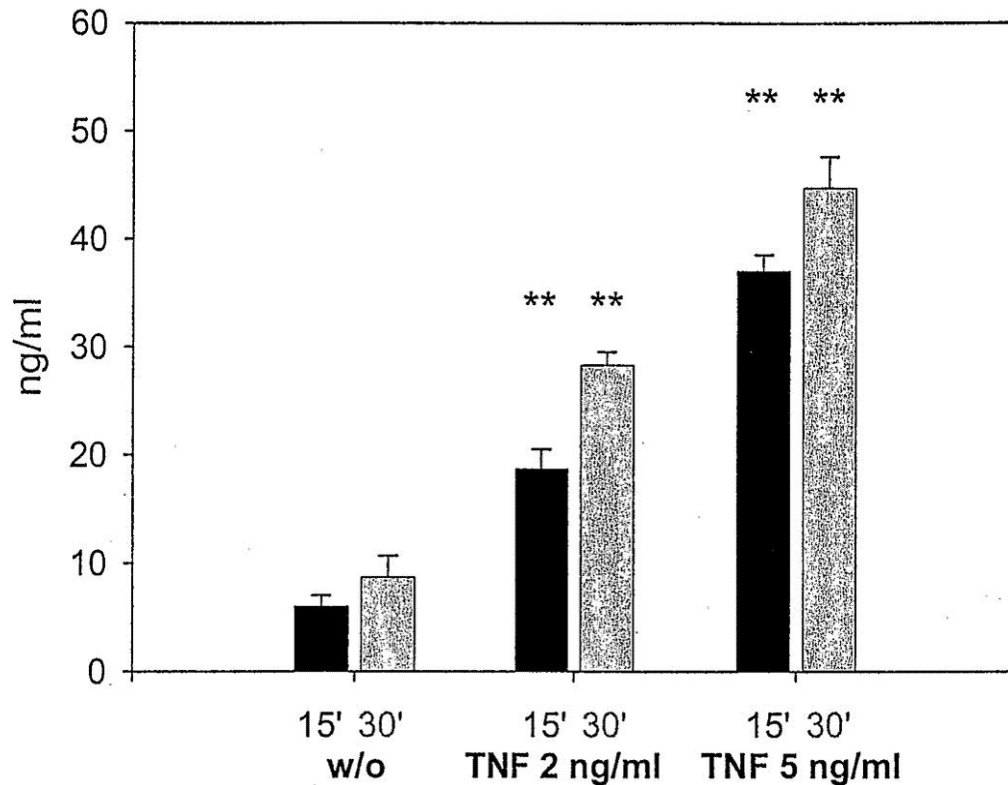
【図 12】

図12



【図 14】

図14

上清中のカルグラヌリンC

【配列表】

2011053222000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年11月29日(2010.11.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

慢性炎症性腸疾患を患う患者において、慢性炎症性腸疾患をモニタリングする方法であって、以下のステップ：

(a) 上記患者から得られた生物学的サンプル中に存在するカルグラヌリンCポリペプチドの量及び／又は濃度を測定し；そして

(b) 上記生物学的サンプル中で測定されたカルグラヌリンCポリペプチドの量及び／又は濃度を、上記患者から得た対照サンプル中で測定されたカルグラヌリンCポリペプチドの量及び／又は濃度と比較する

を含み、ここで上記対照サンプルに比較して、当該上記生物学的サンプル中のカルグラヌリンCポリペプチドの量の増加が上記疾患の悪化を指し、カルグラヌリンCポリペプチドの量の低下が上記疾患の緩和を指す、前記方法。

【請求項2】

特異抗体を、カルグラヌリンCポリペプチドの量及び／又は濃度を測定するために使用する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記特異抗体が、配列番号2に示すアミノ酸配列中に存在するエピトープを認識する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記抗体が、ポリクローナル抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、一本鎖抗体、及び二重特異性抗体を含む群から選ばれる、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記抗体を、E L I S A又は免疫組織化学技術などの免疫アッセイの実行のために使用する、請求項2～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

カルグラヌリンCポリペプチドの量及び／又は濃度を測定することが、カルグラヌリンCのポリペプチドの量及び／又は濃度を局所的マーカーとして測定することに関する、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記生物学的サンプルが、血液、血清、及び便からなる群から選られ、特に血清又は便である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記慢性炎症性腸疾患が、クローン病又は潰瘍性大腸炎から選ばれる、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

慢性炎症性腸疾患の治療効力をモニタリングする方法であって、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法を行い、ここで当該疾患を患う患者から得た前記生物学的サンプルが、慢性炎症性腸疾患の治療を行う患者から得られる、前記方法。

フロントページの続き

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72)発明者 ソルク, クレメンス

ドイツ連邦共和国, 4 8 1 6 1 ミュンスター, アルハルドシュトラーク 2 1

(72)発明者 ロート, ヨハネス

ドイツ連邦共和国, 4 8 1 5 3 ミュンスター, アウグスタシュトラーク 2 9

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CA25 CA26 CB01 CB04 DA36 FB03

【外国語明細書】

2011053222000001.pdf

专利名称(译)	使用钙粒蛋白C诊断炎性疾病的方法		
公开(公告)号	JP2011053222A	公开(公告)日	2011-03-17
申请号	JP2010244271	申请日	2010-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	索尔点击克莱门斯 约翰内斯·罗斯		
申请(专利权)人(译)	Zoruku, 克莱门斯 罗斯, 约翰内斯		
[标]发明人	ゾルククレメン ス ロートヨハネス		
发明人	ゾルク,クレメン ス ロート,ヨハネス		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/564 G01N33/577		
CPC分类号	A61P29/00 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/158 G01N33/564 G01N33/6893 G01N2333/4727 G01N2333/52 G01N2800/065 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB04 2G045/DA36 2G045/ FB03		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎		
优先权	10/077600 2002-02-15 US		
其他公开文献	JP5650985B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供监测炎性疾病，特别是慢性炎症性肠病的方法。 解决方案：测量钙粒蛋白C标记物的量和/或浓度。更具体地，(a) 测量从患者获得的生物样品中钙粒蛋白C多肽的量和/或浓度；(b) 测量患者对照样品中钙粒蛋白C多肽的量和/或浓度通过比较生物样品中钙粒蛋白C多肽的量和/或浓度，生物样品中钙粒蛋白C多肽的量和/或浓度。 点域1

图1

