

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-507337

(P2017-507337A)

(43) 公表日 平成29年3月16日(2017.3.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564	B 4 B 0 2 9
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N 4 B 0 6 3
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	Z N A F 4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 68 頁)

(21) 出願番号 特願2016-563272 (P2016-563272)
 (86) (22) 出願日 平成27年1月13日 (2015.1.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年9月8日 (2016.9.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2015/050052
 (87) 国際公開番号 WO2015/104563
 (87) 国際公開日 平成27年7月16日 (2015.7.16)
 (31) 優先権主張番号 1400521.9
 (32) 優先日 平成26年1月13日 (2014.1.13)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 507226592
 オックスフォード ユニヴァーシティ イ
 ノヴェーション リミテッド
 英国 オーエックス2 オージェイビー オ
 ックスフォード ボトリー ウエスト ウ
 ェイ3 バクストン コート
 (74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稜
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100138911
 弁理士 櫻井 陽子

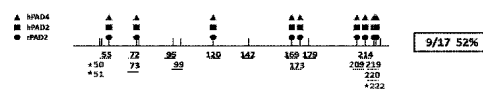
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオマーカーとその利用

(57) 【要約】

本発明は、対象の炎症性疾患の状態を決定する方法であって、前記対象のサンプル中の (i) シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント;および/または (i i) シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに対して特異性のある自己抗体の有無またはレベルを検出することを含む方法、に関する。

Figure 30 A



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象の炎症性疾患の状態を決定する方法であって、前記対象のサンプル中の (i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメント ; および / または (i i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメントに対して特異性のある自己抗体の有無またはレベルを検出することを含む方法。

【請求項 2】

サンプルにおいて検出される (i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメント ; および / または (i i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメントに対して特異性のある自己抗体のレベルを一つまたは複数の基準値と比較する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記対象のサンプル中の (i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメント ; および / または (i i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメントに対して特異性のある自己抗体の存在が、対象が炎症性疾患であると結論づける上で十分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

炎症性疾患の進行をモニターする、または対象に行った治療の有効性をモニターする方法であって、前記対象由来のサンプル中の、 (i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメント ; および / または (i i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体のレベルを検出すること、および、そのレベルを正常値および / または基準値と比較することを含む、方法。

20

【請求項 5】

基準値が、対象における、 (i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメント ; および / または (i i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の、初期レベルである、または、対象における、 (i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメント ; および / または (i i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の、以前に試験した際のレベルである、またはその両方である、請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 6】

対象により提供されるサンプル中の、 (i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメント ; および / または (i i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の、存在またはレベルを検出するための少なくとも一つの薬剤を含む、対象の炎症性疾患の状態の決定に使用するためのキット。

40

【請求項 7】

さらに、シトルリン化テネイシン C またはその一つまたは複数のフラグメントの存在またはレベルを検出するための抗体、および / またはシトルリン化テネイシン C またはその一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在またはレベルを検出するためのシトルリン化テネイシン C の抗原性フラグメントまたはペプチドをさらに含む、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

対象から取得したサンプル中の、 (i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメント ; および / または (i i) シトル

50

リン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の、存在またはレベルの決定の、対象の炎症性疾患の状態を評価する手段としての使用。

【請求項9】

(i)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および/または(ii)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の、炎症性疾患のバイオマーカーとしての使用。

【請求項10】

炎症性疾患が、関節リウマチ(RA)、自己免疫症状、炎症性腸疾患(クローン病および潰瘍性大腸炎を含む)、非治癒性創傷、多発性硬化症、がん、アテローム動脈硬化症、シェーグレン病、糖尿病、エリテマトーデス(全身性エリテマトーデスを含む)、喘息、線維性疾患(肝硬変症を含む)、肺線維症、紫外線損傷、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、筋炎および循環器病を含む群から選択される、請求項1~9のいずれか一項に記載の方法、キット、または使用。

10

【請求項11】

炎症性疾患が関節リウマチである、請求項10に記載の方法、キット、または使用。

【請求項12】

(i)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および/または(ii)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在が炎症性の症状の徴候である、請求項1~11のいずれか一項に記載の方法、キット、または使用。

20

【請求項13】

(i)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および/または(ii)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在が関節リウマチの徴候である、請求項12に記載の方法、キット、または使用。

【請求項14】

サンプルが、前記対象由来の血液、血清、血漿、滑液および/または関節組織である、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法、キット、または使用。

30

【請求項15】

実施例および図面を参照して実質的に本明細書に記載される、炎症性疾患の状態を決定する方法。

【請求項16】

実施例および図面を参照して実質的に本明細書に記載される、キット。

【請求項17】

実施例および図面を参照して実質的に本明細書に記載される、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、慢性炎症におけるシトルリン化テネイシンCおよびその活性に関する。特に、本発明は、シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCに特異性のある自己抗体の、関節リウマチのような炎症性疾患のバイオマーカーとしての使用に関する。

【背景技術】

【0002】

炎症は、病原体、組織損傷、または刺激物のような有害な刺激に対する、組織の複雑な生物学的応答である。炎症は、傷害性の刺激を取り除き、組織の治癒プロセスを開始させるための、組織による保護的な試みである。炎症に関連する異常には、種々のヒトの疾病

50

の根底をなす、広範囲に渡る、互いに無関係な疾患のグループ（炎症性疾患）が含まれる。炎症性の側面を有する疾病の例には、（限定されないが）喘息、自己免疫病、糸球体腎炎、アレルギー（過敏症）、炎症性腸疾患、再灌流傷害、関節リウマチおよび移植片拒絶が含まれる。

【 0 0 0 3 】

特に、慢性炎症は、上述の多くの疾病に関連する、衰弱性の重篤な症状であり、自己免疫病で見られるように、持続性の炎症および/または免疫応答の変化を特徴とする。

【 0 0 0 4 】

関節リウマチ（RA）は、決して唯一の例ではないが、慢性炎症性疾患の典型例である。RAは、炎症促進性サイトカインおよび細胞外マトリックス分解酵素（MMP）の持続的な合成によって媒介される、滑膜炎および関節の軟骨や骨の破壊を特徴とする。TNFやIL-6のような炎症性サイトカインの合成を抑制する生物学的な化合物は、短期的にRAを治療するのに成功している。しかしながら、生物学的な化合物は反復治療を必要とし、よって高価な治療アプローチとなり、長期寛解には至らない。さらに、サイトカイン機能の完全な全身性の抑制は、感染リスクの増加のような特有の問題がないわけではない。治療の進歩にもかかわらず、長期に渡って効果的な、慢性炎症性治療の経済的方法に対する満たされていないニーズが、依然として存在する（Smolen (2006)およびWilliams (2007)）。

10

【 0 0 0 5 】

疾病の慢性化を裏打ちするメカニズムは依然として不明であり、炎症性かつ破壊性のメディエーターの長期に渡る発現を引き起こす因子は、今のところ知られていない。

20

【 0 0 0 6 】

Toll様受容体（TLR）が、RAにおいて炎症性メディエーターの産生を引き起こす重要な役割を果たしており、TLRの機能の遮断が大いに臨床的に有効である可能性がある（Brentano (2005)およびO'Neill (2002)に概説されている）。

【 0 0 0 7 】

テネインCは、組織損傷および創傷の修復に関連する、細胞外マトリックス糖タンパク質である。テネインCは、胚発生の期間の活発な組織再構成の間に特異的に発現され、原腸陥入および体節形成の期間に最初に観察される。発生の後期では、発現は、乳腺および肺の分枝形態形成の部位、発生途中の骨格や循環器、上皮間葉転換の部位の結合組織に制限される。発現は、これらのプロセスが終了し、胚発生が完了する前に、負に制御される（Jones (2000)）。

30

【 0 0 0 8 】

テネインCは、健康な成人の組織では通常は発現されていないが、成人では急性炎症の際に特異的かつ一過性に正に制御され、また慢性炎症においては持続的に発現される（Chiquet-Ehrismann (2003)に概説されている）。免疫組織化学の研究により、正常なヒトの関節においてテネインCはほとんど発現されていないが、RAの滑膜、炎症や線維症の領域、特に滑膜表層下、浸潤性のパンヌス、および血管周辺において、テネインCの発現レベルは非常に大きいことが明らかになっている（Cutolo (1992)、MacCachren (1992)およびSalter (1993)）。RA患者の滑液において（Chevalier (1994)およびHasegawa (2007)）、およびRAの軟骨においてもまた（Salter (1993)およびChevalier (1994)）、テネインCのレベルの顕著な増加がみられる。

40

【 0 0 0 9 】

テネインCは、1,500,000ダルトンの、大きな六量体のタンパク質である。各鎖は、アセンブリドメイン（TA）、EGF様リピート（EGF-L）、フィブロネクチンIII型ドメイン（fibronectin type III like repeats）（TNIII）およびフィブリノーゲン様グループ（FBG）を含む、複数のドメインを含んでいる（Orend (2005)に概説されている）。テネインCおよびそのドメインの配列は、図13に示した。

【 0 0 1 0 】

本発明者は、テネインCが、関節炎で見られる破壊性の関節炎症にとって必要であり

50

、また慢性炎症性疾患を特徴付ける炎症性応答の持続に関係する、内在性のTLR4リガンドであることを、既に明らかにしている。特に、テネイシンCはTLR4の内在性の活性化因子であることが明らかにされており、当該分子が破壊性の関節炎症にとって必要であることが証明されている(WO 2010/103289)。

【0011】

テネイシンCの厳密な発現制御パターンにより、テネイシンCは慢性炎症を診断するための魅力的な標的となっている。テネイシンCは健康な成人にはほとんど存在しないが、組織損傷に特異的に発現が誘導される。急性炎症の際、テネイシンCは一時的に発現される：誘導はしばしば炎症に先立って起こり、mRNAおよびタンパク質は共に、炎症が消散した時には組織に存在しない(Chiquet-Ehrismann (2003)に概説されている)。

10

【0012】

テネイシンCの持続的な発現は、慢性炎症と関連することが、現在明らかになっている。テネイシンCのレベルの増加は、RAに加えて、多発性硬化症(Gutowski (1999))およびシェーグレン病(Amin (2001))を含む他の自己免疫病において、また非治癒性創傷および糖尿病性かつ静脈性の潰瘍において(Loots (1998))、観察される。テネイシンCの新規合成は、口腔粘膜の疾病における炎症強度とよく相関し、またテネイシンCの血漿レベルは、薬物療法または手術の前後の炎症性腸疾患の活性に対する信頼性のある指標である(Chiquet-Ehrismann (2003)に概説されている)。

【発明の概要】

【0013】

本発明者は、驚くべきことに、テネイシンCがインビトロでシトルリン化され得ること、およびシトルリン化テネイシンCが慢性炎症性疾患の患者に優先的に発見されることを、今回明らかにした。

20

【0014】

シトルリン化は、ペプチジルアルギニン Deputy (PAD)によって媒介される、アルギニン残基のシトルリンへの変換に起因する。当該翻訳後修飾は、皮膚および中枢神経系において生理学的に生じ、炎症部位において病理学的に生じる。当該変化は、タンパク質のコンフォメーション、イオン相互作用、タンパク質切断に対する感受性に、大きく影響を与える。シトルリン化によってまた、特異的な抗体を産生させる新規のエピトープが作り出される。シトルリン化タンパク質に対する抗体(ACPA)は、特異的にシトルリン化タンパク質抗原を認識する。さらに、シトルリン化によって作り出されたエピトープはまた、HLA-DR、T細胞受容体、および自然免疫系の特異的リガンドへのタンパク質の結合を決定しうる(67)。

30

【0015】

ACPAはRA患者において見出されており、このことが当該疾病を診断する一つの方法である。さらに最近になって、ACPAが当該疾病を活発に促進することもまた、明らかになってきている。しかしながら、ACPAが認識するタンパク質は十分に特徴付けられていない。これまでのところ、RA滑液中と同定され、エピトープマッピングされ、複数の研究室で抗体の特異性が再現性よく確認されているシトルリン化抗原(67)は、フィブリノーゲン、II型コラーゲン、ビメンチンおよび - エノラーゼに限られる。

40

【0016】

本発明者は既に、シトルリン化 - エノラーゼを、RAの自己抗原として同定し、診断および病因の両方において、シトルリン化 - エノラーゼの重要性を証明した(68-74)。他のグループの最近のデータにより、ACPAとその抗原もまた、病因に積極的に寄与していることが示唆されている。例えばシトルリン化フィブリノーゲン含有免疫複合体は、実験マウスの関節炎を強め(75、76)、ヒト単核球のToll様受容体4(TLR4)およびFc受容体の活性化により、サイトカイン合成を相乗的に促進する(77、78)。

【0017】

RA患者において、フィブリノーゲンがシトルリン化されるていること、またシトルリ

50

ン化された形態のフィブリノーゲンに対する抗体が存在することが、長い間知られている。Sokolove (2011) (16) によって、フィブリノーゲンは、シトルリン化されると、天然のフィブリノーゲンよりも優れた TLR4 の活性化因子であること、およびシトルリン化フィブリノーゲンは、相乗的な TLR - Fc 受容体シグナル伝達を介して炎症を活性化させる抗体と複合体を形成することが明らかにされている。このように、フィブリノーゲンタンパク質の修飾は、RA の炎症を悪化させる。

【0018】

本発明者は既に、炎症促進性糖タンパク質テネイシンCを、自然免疫応答および適応免疫応答の内在性活性化因子として同定し、テネイシンCの発現がインビボでの慢性関節炎に必要であることを示した(79、80)。さらに、高レベルのテネイシンCが、RAの滑膜(81)および血清(82)に見られた。WO2013/088140では、炎症性疾患のバイオマーカーとしてのテネイシンCの利用、特に、びらん性RAのバイオマーカーとしてのテネイシンCの利用について述べている。

10

【0019】

しかしながら、テネイシンCがシトルリン化され得ること、当該シトルリン化がテネイシンCの炎症促進性活性を調節し得ること、シトルリン化テネイシンCが自己抗原であり得ることは、いずれも、これまで考慮していなかった。

【0020】

本発明者は、全長テネイシンC、およびFBGドメインを含む個々のドメイン(FBGドメインに限らない)が、インビトロでシトルリン化によって翻訳後修飾され得ることを、今回明らかにした。本発明者は、シトルリン化FBGが、初期のヒトマクロファージによるサイトカイン合成を、天然のFBGよりも良好に刺激することを示す。本発明者は、RA患者のみがシトルリン化テネイシンCを認識する抗体を持っており、健常対照は持っていないこと、また、RA患者および健常対照由来の血清が、天然の、すなわち非シトルリン化のテネイシンCと反応しないことを明らかにした。本発明者はまた、RA患者において、FBGドメインと併せて、他のテネイシンCのドメインがシトルリン化されることもまた、示す。

20

【0021】

これは、テネイシンCがシトルリン化されることについての最初の発見であり、テネイシンCの当該修飾がRAと関連していることについての最初の証明である。本発明者はシトルリン化が、テネイシンCがRAにおいて炎症を引き起こす、少なくとも三つの主要な新規のメカニズムを提供して、テネイシンCの炎症性の能力を高めるよう作用することもまた、示している。シトルリン化抗原、すなわちテネイシンCの炎症促進性効果は、重要な発見である。なぜなら、本発見は、ACPA含有テネイシンC免疫複合体の、抗体成分(例えば、Fc受容体シグナル伝達による)および抗原成分(例えば、TLRシグナル伝達による)の両方が炎症促進性であることを示しているからである。従って、シトルリン化テネイシンC単独、シトルリン化テネイシンCの自己抗体単独、またはシトルリン化テネイシンC-抗体複合体が、疾病において炎症を引き起こすことができる。

30

【0022】

さらにより驚くべき事に、本発明者は、FBG-Cにおいて、シトルリン化され、ACPAの標的であるアミノ酸が、フィブリノーゲンの領域のホモログでないことを見出した。各タンパク質中の同じ配列が修飾されると予測されるため、このことは驚くべきことである。

40

【0023】

従って、FBGドメインを含むテネイシンCのドメインがRAにおいてシトルリン化されていること、またシトルリン化テネイシンCに対する抗体がRA患者において優先的に発見されることが、今回初めて明らかとなった。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明の第一の局面に従えば、対象の炎症性疾患の状態を決定する方法であって、前記

50

対象由来のサンプル中において、(i)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント;および/または(ii)シトルリン化テネイシンCおよび/または一つまたは複数のシトルリン化テネイシンCのフラグメントに特異性のある自己抗体の有無またはレベルを検出することを含む方法、が提供される。

【0025】

炎症性疾患は、不適切な炎症と関連するいずれの症状を伴ってもよい。当該疾患は、限定されないが、関節リウマチ(RA)、自己免疫症状、炎症性腸疾患(クローン病および潰瘍性大腸炎を含む)、非治癒性創傷、多発性硬化症、がん、アテローム動脈硬化症、シェーグレン病、糖尿病、エリテマトーデス(全身性エリテマトーデスを含む)、喘息、線維性疾患(肝硬変症を含む)、肺線維症、紫外線損傷、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、筋炎および循環器病を含む。

【0026】

他を排除するわけではないが、特に、本発明は、関節リウマチ(RA)に関連する慢性炎症に、関係している。

【0027】

「炎症性疾患の状態」という表現は、炎症性疾患の識別可能ないずれの徴候も含み、限定されないが、炎症性疾患の有無、炎症性疾患の発症リスク、炎症性疾患のステージ、炎症性疾患の進行、炎症性疾患への治療に対する対象における有効性または応答、を含む。

【0028】

好ましい実施形態において、言及される炎症性疾患は関節リウマチであり、本発明の方法によって、限定されないが、関節リウマチの有無、関節リウマチの発症リスク、関節リウマチのステージ、関節リウマチの進行、関節炎の寛解、関節リウマチの最も可能性の高い治療、および関節リウマチの治療に対する対象における有効性または応答、の測定を可能にする。

【0029】

例えば、本発明の方法は、以下の目的のうちの任意の一つまたは複数のために、使用してもよい:対象の関節リウマチを診断すること;対象が関節リウマチを発症する確立を評価すること;関節リウマチである対象の予後について助言すること;疾病の進行をモニターすること;治療の選択肢について助言すること、および対象の関節リウマチの治療に対する有効性または応答をモニターすること。

【0030】

好ましくは、本方法は、対象によって提供されたサンプル中の、(i)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント;および/または(ii)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の有無またはそのレベルの解析から、対象の関節リウマチを診断することを可能にする。本方法は、他の関節リウマチの症状がなくても、関節リウマチの診断を対象に行うことを可能にする。

【0031】

サンプル中のシトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントの存在、および所望によりそのレベルは、任意の最適なアッセイによって測定されてよく、任意の最適なアッセイには、免疫測定法、分光法、ウエスタンブロット、ELISA、免疫沈降、スロットまたはドットブロットアッセイ、等電点電気泳動法、SDS-PAGEおよび抗体マイクロアレイ免疫組織染色、放射性免疫測定法(RIA)、蛍光免疫測定、アビジン-ビオチンまたはストレプトアビジン-ビオチンシステムを用いた免疫測定法などを含む群のいずれかの方法、またはこれらの組み合わせの利用が含まれてもよい。これらの方法は当業者には十分知られている。

【0032】

サンプル中のシトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントの存在、および所望によりそのレベルは、天然のテネイシン

10

20

30

40

50

Cに結合しない、シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異的な抗体を用い、その後例えばELISAおよび/またはウエスタンブロットによって免疫測定することにより、決定してもよい。血清または組織/細胞のいずれかにおいて、免疫測定は好ましくはサンドイッチELISAである。すなわち、シトルリン化テネイシンC(citTNC)抗体を捕捉抗体として使用し、その後血清/組織可溶化液を最適な希釈液として添加し、その後別のcitTNC二次抗体を検出のために使用する。いずれの標準的なELISAプロトコールにもあるように、二次抗体は、検出または間接的検出のために標識することができる。二つの異なる好適なcitTNC抗体が見つけれられない場合は、プレート上の血清/組織可溶化液およびここに直接添加した抗体から構成される、ELISAの直接法を使用する。あるいは、非シトルリン化-TNC抗体を捕捉のために使用してもよく、シトルリン化-TNC抗体を検出のために使用してもよい。あるいは逆も同様である。

10

【0033】

ある実施形態において、天然のTNCとシトルリン化TNCの比が測定されてもよい。関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチに対して予測的または診断的である、シトルリン化TNCと天然のTNCの比は、少なくとも1:2であってよい。関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの予測的または診断的、シトルリン化TNCと天然のTNCの比は、少なくとも1:1であってよい。関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの予測的または診断的、シトルリン化TNCと天然のTNCの比は、少なくとも2:1であってよい。関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの予測的または診断的、シトルリン化TNCと天然のTNCの比は、少なくとも5:1であってよい。関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの予測的または診断的、シトルリン化TNCと天然のTNCの比は、少なくとも10:1であってよい。関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの予測的または診断的、シトルリン化TNCのレベルは、血清または血漿中20ng/mlを超えるレベルであってよい。ある実施形態において、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの予測的または診断的、シトルリン化TNCのレベルは、血清または血漿中25ng/mlを超えるレベルであってよい。あるいは、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの予測的または診断的、シトルリン化TNCのレベルは、血清または血漿中31ng/mlを超えるレベルであってよい。関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの予測的または診断的、シトルリン化TNCのレベルは、血清または血漿中33ng/mlを超えるレベルであってよい。関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの予測的または診断的、シトルリン化TNCのレベルは、血清または血漿中のcTNCにおいて、正常なサンプルのcTNCのレベルと比較して、50%を超えて増加したレベルであってよい。関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの予測的または診断的、シトルリン化TNCのレベルは、血清または血漿中のcTNCにおいて、正常なサンプルのTNCのレベルと比較して、50%を超えて増加したレベルであってよい。例えば、正常なサンプルは非RA患者または非びらん性RA患者由来のサンプルから測定された値であってよい。あるいは、正常なサンプルは、RAまたはびらん性RAを患う前の同じ患者のサンプルから測定された値であってよい。

20

30

40

【0034】

ある実施形態において、シトルリン化TNCに対する自己抗体の存在を測定することは、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチに対して予測的または診断的であり得る。あるいは、シトルリン化TNCに対する自己抗体の存在が少なくとも50%増加することは、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチに対して予測的または診断的であり得る。

【0035】

あるいは、テネイシンCおよび/またはテネイシンCのフラグメントは免疫沈降されてもよく、その後、テネイシンCがシトルリン化されているかどうかを測定するために、ウエスタンブロットングまたはマススペクトロメトリーが用いられてもよい。

【0036】

50

シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCのフラグメントに対して特異性を有する自己抗体を含むサンプルは、実施例に記載したように、RA血清によるウエスタンブロッティングを用いて測定されてもよい。

【0037】

あるいは、テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCのフラグメントにおいてシトルリン化された残基は、より明確にされてもよく、従ってペプチドアッセイが作成されてもよい(上記のようなウエスタンブロット、および/またはELISA法のいずれか)。シトルリン化されたペプチドのみが作成され、コントロールとして、非シトルリン化ペプチドが作成される。プレートはペプチドでコーティングされ、RA血清がアプライされ、抗体を検出するために使用される(詳細な方法は、Lundberg (2008)参照)。アッセイに用いられるシトルリン化テネイシンCペプチドは、残基50、51、55、72、120、169、173、209、214、219、220および222を含む群のいずれか;またはその組み合わせ(配列番号70から決定される残基番号)から選択されるシトルリン化残基を含む、任意のテネイシンCペプチドを含んでもよい。アッセイに用いられるシトルリン化テネイシンCペプチドは、残基55、72、120、169、173、209、214、219、および220を含む群のいずれか;またはその組み合わせから選択されるシトルリン化残基を含む、任意のテネイシンCペプチドを含んでもよい。ある実施形態において、当該ペプチドはシトルリン化残基CIT551、CIT209、CIT214、CIT219、および/またはCIT220を含んでもよい。ある実施形態において、当該ペプチドはシトルリン化残基CIT50を含んでもよい。ある実施形態において、当該ペプチドはシトルリン化残基CIT51を含んでもよい。ある実施形態において、当該ペプチドはシトルリン化残基CIT55を含んでもよい。あるいは、当該ペプチドはシトルリン化残基CIT209および/またはCIT214を含んでもよい。あるいは、当該ペプチドはシトルリン化残基CIT219および/またはCIT220を含んでもよい。あるいは、当該ペプチドはシトルリン化残基CIT222を含んでもよい。上記ペプチドの組み合わせもまた、プールとして使用してもよい。同配列に対応する非シトルリン化ペプチドをアッセイコントロールとして、使用してもよい。

10

20

【0038】

シトルリン化テネイシンCペプチド、またはそのフラグメントは、ペプチドアッセイに使用するために、例えば抗体認識を助ける目的で、ループ状または環状の構造をとってもよい。

30

【0039】

ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシンCペプチドまたはそのフラグメントは、CIT50、CIT51、CIT55、CIT72、CIT120、CIT169、CIT173、CIT209、CIT214、CIT219、CIT220およびCIT222から選択される一つまたは複数のシトルリン化残基;またはその組み合わせを有する、配列番号70の一部の配列を含んでもよい。あるいは、ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシンCペプチドまたはそのフラグメントは、CIT55、CIT72、CIT120、CIT169、CIT173、CIT209、CIT214、CIT219、およびCIT220から選択される一つまたは複数のシトルリン化残基;またはその組み合わせを有する、配列番号70の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシンCペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基CIT50を有する配列番号70の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシンCペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基CIT51を有する配列番号70の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシンCペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基CIT55を有する配列番号70の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシンCペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基CIT72を有する配列番号70の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシンCペプチドまたはそのフラグメントは、シトル

40

50

リン化残基 C I T 1 2 0 を有する配列番号 7 0 の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシン C ペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基 C I T 1 6 9 を有する配列番号 7 0 の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシン C ペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基 C I T 1 7 3 を有する配列番号 7 0 の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシン C ペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基 C I T 2 0 9 を有する配列番号 7 0 の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシン C ペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基 C I T 2 1 4 を有する配列番号 7 0 の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシン C ペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基 C I T 2 1 9 を有する配列番号 7 0 の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシン C ペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基 C I T 2 2 0 を有する配列番号 7 0 の一部の配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに使用する、シトルリン化テネイシン C ペプチドまたはそのフラグメントは、シトルリン化残基 C I T 2 2 2 を有する配列番号 7 0 の一部の配列を含んでもよい。互いに異なるシトルリン化残基を有する、配列番号 7 0 の二つ以上の異なるフラグメントを使用してもよい。配列番号 7 0 のフラグメントまたは配列はまた、その変異体を含んでもよい。例えば、ある変異体は、配列番号 7 0 由来の配列に加えて、付加的なアミノ酸残基または修飾を有してもよい。

10

【 0 0 4 0 】

20

シトルリン化テネイシン C ペプチドまたは配列番号 7 0 の一部の配列は、約 5 ~ 約 2 5 の連続したアミノ酸残基を含んでもよい。シトルリン化テネイシン C ペプチドまたは配列番号 7 0 の一部の配列は、約 1 0 ~ 約 2 5 の連続したアミノ酸残基を含んでもよい。シトルリン化テネイシン C ペプチドまたは配列番号 7 0 の一部の配列は、約 1 5 ~ 約 2 5 の連続したアミノ酸残基を含んでもよい。シトルリン化テネイシン C ペプチドまたは配列番号 7 0 の一部の配列は、約 1 8 ~ 約 2 2 の連続したアミノ酸残基を含んでもよい。シトルリン化テネイシン C ペプチドまたは配列番号 7 0 の一部の配列は、約 8 ~ 約 2 0 の連続したアミノ酸残基を含んでもよい。

【 0 0 4 1 】

例えば、ペプチドアッセイに用いられるシトルリン化テネイシン C ペプチドは、配列番号 5 5、配列番号 5 7、配列番号 5 9、配列番号 6 1、配列番号 6 3 および配列番号 6 4 ; またはその変異体を含む群のいずれかおよび / またはその組み合わせから選択されるペプチド配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに用いられるシトルリン化テネイシン C ペプチドは、配列番号 5 5 またはその変異体のペプチド配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに用いられるシトルリン化テネイシン C ペプチドは、配列番号 5 7 またはその変異体のペプチド配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに用いられるシトルリン化テネイシン C ペプチドは、配列番号 5 9 またはその変異体のペプチド配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに用いられるシトルリン化テネイシン C ペプチドは、配列番号 6 1 またはその変異体のペプチド配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに用いられるシトルリン化テネイシン C ペプチドは、配列番号 6 3 またはその変異体のペプチド配列を含んでもよい。ペプチドアッセイに用いられるシトルリン化テネイシン C ペプチドは、配列番号 6 4 またはその変異体のペプチド配列を含んでもよい。

30

40

【 0 0 4 2 】

前記対象由来のサンプル中の、(i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメント ; および / または (i i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在は、対象が炎症性疾患を有すると結論付けるのに十分であろう。

【 0 0 4 3 】

本発明の方法は、サンプルにおける (i) シトルリン化テネイシン C および / またはシ

50

トルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメント；および/または(i i)シトルリン化テネインCおよび/またはシトルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の測定レベルを、一つまたは複数の基準値と比較するステップをさらに含んでもよい。

【0044】

好ましくは、シトルリン化テネインCまたはそのフラグメント、および/またはシトルリン化テネインCまたはそのフラグメントに特異性のある自己抗体の測定レベルと比較される基準値は、関節リウマチのような検出可能な炎症性疾患、または関節リウマチのような炎症性疾患の臨床症状を、いずれも有さず、かつ、シトルリン化テネインCまたはそのフラグメント、および/またはシトルリン化テネインCまたはそのフラグメントに特異性のある自己抗体がいわゆる「正常値」である、一人または複数の対象において観察される、シトルリン化テネインCまたはそのフラグメント、および/またはシトルリン化テネインCまたはそのフラグメントに特異性のある自己抗体のレベルである。

10

【0045】

さらなる実施形態において、シトルリン化テネインまたはそのフラグメントの、天然のテネインCに対する比が、考慮および比較されてもよい。

【0046】

あるいは、シトルリン化テネインCまたはそのフラグメントおよび/またはシトルリン化テネインCに特異性のある自己抗体またはそのフラグメントの測定レベルと比較される基準値は、特定の対象について以前に取得した値であってもよい。本方法が疾病の進行をモニターするため、または特定の治療に対する対象の応答をモニターするために用いられるのであれば、この種の基準値が使われてもよい。

20

【0047】

(i)シトルリン化テネインCおよび/またはシトルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメント；および/または(i i)シトルリン化テネインCおよび/またはシトルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の、存在またはレベルは、患者を分類するために使用されてもよい。このような分類が、適当な治療を決定するために使用されてもよい。例えば、シトルリン化テネインCまたはそのフラグメントにおいて、特異的なシトルリン化残基を検出することによって、患者を分類してもよい。患者は、CIT55陽性(すなわち、配列番号70の残基55がシトルリン化されている)であってもよい。さらに、または、あるいは、患者はCIT209および/またはCIT214陽性であってもよい。患者は、CIT219および/またはCIT220陽性であってもよい。いくつかの実施形態において、患者はCIT55、CIT72、CIT120、CIT169、CIT173、CIT209、CIT214、CIT219、およびCIT220陽性であってもよく；これらのシトルリン化残基の組み合わせに陽性であってもよい。他の実施形態において、患者はCIT50、CIT51、CIT55、CIT72、CIT120、CIT169、CIT173、CIT209、CIT214、CIT219、CIT220およびCIT222陽性であってもよく；これらのシトルリン化残基の組み合わせに陽性であってもよい。それゆえ、ある実施形態において、患者の特異的残基のシトルリン化を測定する。患者の一つまたは複数の特異的残基50、51、55、72、120、169、173、209、214、219、220および/または222(配列番号70に従って番号付けした残基)のシトルリン化を測定してもよい。あるいは、患者の一つまたは複数の特異的残基55、72、120、169、173、209、214、219および/または220(配列番号70に従って番号付けした残基)のシトルリン化を測定してもよい。

30

40

【0048】

あるいは、または、さらに、自己抗体を検出する実施形態において、自己抗体のエピトープは、特異的なシトルリン化残基、例えば、一つまたは複数のCIT50、CIT51、CIT55、CIT72、CIT120、CIT169、CIT173、CIT209、CIT214、CIT219、CIT220およびCIT222；または一つまたは複

50

数のCIT55、CIT72、CIT120、CIT169、CIT173、CIT209、CIT214、CIT219、およびCIT220を有することに基づいて、区別される。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT50を有することに基づいて、区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT51を有することに基づいて、区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT55を有することに基づいて、区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT72を有する事に基づいて、区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT120を有することに基づいて区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT169を有することに基づいて、区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT173を有することに基づいて、区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT209を有することに基づいて、区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT214を有することに基づいて、区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT219を有することに基づいて、区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT220を有することに基づいて、区別されてもよい。自己抗体のエピトープは、特異的シトルリン化残基CIT222を有することに基づいて、区別されてもよい。

10

【0049】

様々なシトルリン化または関連エピトープの存在は、c i t F B Gをいかに標的とするかを明確にすることができる。例えば、CIT55が検出されれば、F B Gの免疫原性活性を治療薬によってブロックできるであろう。インテグリン結合部位がシトルリン化されていれば（例えばCIT169および/またはCIT173）、当該ドメインの作用を治療薬によってブロックできるであろう。

20

【0050】

本発明の方法はまた、関節リウマチのような炎症性疾患の進行をモニターするために、および/または対象に行った治療の有効性をモニターするために、用いられてもよい。このことは、対象から得られたサンプルを、最初の診断後の様々な時点で解析し、(i)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および/または(ii)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体のレベルの変化をモニターし、これらのレベルを正常値および/または基準値と比較することによって達成されてもよい。この場合、基準値は、対象のシトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメント、および/またはシトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の初期レベルを含んでもよく；または、対象のシトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメント、および/またはシトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の最後に試験した際のレベルを含んでもよく、またはその両方を含んでもよい。

30

【0051】

本発明の方法はまた、対象に対する適切な治療を決定するために用いられてもよい。本方法は、オーダーメイド医療の解決策を提供するために用いられてもよい。ある実施形態において、サンプル中のi)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および/または(ii)シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在が、関節リウマチのような炎症性疾患の診断をもたらすのに十分であり、最適な治療とは何かを示すのに用いられる。

40

【0052】

抗TNF薬；抗IL17治療；T細胞同時刺激修飾薬（例えばOrencia^(商標) - アバタセプト）；インターロイキン6（IL-6）阻害薬（例えばActemra^(商標) - トシリズマブ）；抗CD20抗体（例えばRituxan^(商標) - リツキシマブ）；B細胞活性化因子（例

50

例えば抗 B A F F)、のうち一つまたは複数の治療的に有効な量を使用することは、対象が、対象由来のサンプル中に i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメント ; および / または (i i) シトルリン化テネイシン C および / またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体を有していれば、適しているであろう。他の代替可能な治療には、ヤヌスキナーゼ (J A K) 阻害薬 (例えば Tofacitinib^(商標))、脾臓チロシンキナーゼ (S y k) 阻害薬 (例えば Fostamatinib^(商標))、抗 T N C 抗体またはシトルリン化テネイシン C ドメインの抗体が含まれる。

【 0 0 5 3 】

あるいは、または、さらに、治療は、シトルリン化テネイシン C またはシトルリン化テネイシン C の一つまたは複数のフラグメントの生物学的活性を調節する薬剤の治療的に有効な量を投与することであってもよい。薬剤は、シトルリン化テネイシン C またはその一つまたは複数のフラグメントの生物学的活性を、次のうちの一つまたは複数の方法で、調節してもよい :

- ・シトルリン化テネイシン C またはその一つまたは複数のフラグメントの、一つまたは複数の物理的特性を変化させること ;

- ・シトルリン化テネイシン C またはその一つまたは複数のフラグメントの、結合特性を変化させること ;

- ・シトルリン化テネイシン C またはその一つまたは複数のフラグメントの、抗原性を変化させること ;

- ・シトルリン化テネイシン C またはその一つまたは複数のフラグメントの、シトルリン化のレベルを変化させること ;

- ・非シトルリン化テネイシン C またはその一つまたは複数のフラグメントに対する、シトルリン化テネイシン C の比を変化させること、例えば一つまたは複数の特異的ドメイン (例えば F B G ドメイン) のシトルリン化を変化させること ;

- ・テネイシン C またはそのフラグメントの、一つまたは複数の特異的シトルリン化残基を、非シトルリン化残基の形態に変化させることであって、特異的シトルリン化残基は、5 5、7 2、1 2 0、1 6 9、1 7 3、2 0 9、2 1 4、2 1 9、および 2 2 0 残基を含む群のいずれか ; またはその組み合わせから選択されてもよい ; または、

- ・テネイシン C またはそのフラグメントの、一つまたは複数の特異的シトルリン化残基を、非シトルリン化残基の形態に変化させることであって、特異的シトルリン化残基は、5 0、5 1、5 5、7 2、1 2 0、1 6 9、1 7 3、2 0 9、2 1 4、2 1 9、2 2 0 および 2 2 2 残基を含む群のいずれか ; またはその組み合わせから選択されてもよい。

【 0 0 5 4 】

特異的シトルリン化残基は、一つまたは複数の C I T 5 5、C I T 2 0 9、C I T 2 1 4、C I T 2 1 9 および C I T 2 2 0 を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、C I T 5 0 を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、C I T 5 1 を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、C I T 5 5 を含んでもよい。ある実施形態において、特異的シトルリン化残基は、C I T 2 0 9 および / または C I T 2 1 4 を含んでもよい。あるいは、特異的シトルリン化残基は、C I T 2 1 9 および / または C I T 2 2 0 を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、C I T 2 2 2 を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、エピトープの形態で検出されてもよい。例えば、本方法は、エピトープの検出を含んでもよく、エピトープは C I T 5 5、C I T 2 0 9、C I T 2 1 4、C I T 2 1 9 および C I T 2 2 0 から選択される少なくとも一つのシトルリン化残基 ; またはその組み合わせを含む。エピトープはシトルリン化残基 C I T 5 0 を含んでもよい。エピトープはシトルリン化残基 C I T 5 1 を含んでもよい。エピトープはシトルリン化残基 C I T 5 5 を含んでもよい。エピトープはシトルリン化残基 C I T 2 0 9 を含んでもよい。エピトープはシトルリン化残基 C I T 2 1 4 を含んでもよい。エピトープはシトルリン化残基 C I T 2 1 9 を含んでもよい。エピトープはシトルリン化残基 C I T 2 2 0 を含んでもよい。エピトープはシトルリン化残基 C I T 2 2 2 を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

シトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメントの生物学的活性を調節する薬剤は、シトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメントの生物学的活性を、下方制御または上方制御してもよい。

【 0 0 5 6 】

シトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメントの生物学的活性を調節する薬剤は、テネイシンCのシトルリン化の阻害薬；または、シトルリン化テネイシンCの結合特性の阻害薬；または、シトルリン化テネイシンCの競合的結合の阻害薬であってもよい。

【 0 0 5 7 】

シトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメントの生物学的活性を調節する薬剤は、T o l l様受容体4および/またはF c 受容体のアンタゴニストであってもよい。

【 0 0 5 8 】

シトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメントの生物学的活性を調節する薬剤は、低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、シトルリン化テネイシンCに結合親和性を持つ化合物、抗体(ポリクローナル、またはモノクローナル)およびその抗原結合性フラグメント、阻害薬の低分子化合物、シトルリン化テネイシンCまたはその変異体のドメイン、ポリペプチドおよびタンパク質からなる群から選択されてもよい。薬剤が抗体または抗原結合性フラグメントである場合、薬剤はT o l l様受容体4 (TLR4)、シトルリン化テネイシンCもしくはそのフラグメント/ドメインに特異性があってもよく；またはシトルリン化テネイシンCのFBGドメインに結合親和性があってもよい。

【 0 0 5 9 】

シトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメントの生物学的活性を調節する薬剤は、シトルリン化テネイシンCのFBGドメインの生物学的活性を調節してもよい。

【 0 0 6 0 】

シトルリン化テネイシンCまたはその一つまたは複数のフラグメントの生物学的活性を調節する薬剤は、少なくともFBGドメインがシトルリン化された；FBGドメインのみがシトルリン化された；またはFBGドメインの他に一つまたは複数のドメインがシトルリン化された(例えばフィブロネクチンIII型ドメイン(fibronectin type III like repeats))、シトルリン化テネイシンCの活性を調製してもよい。シトルリン化テネイシンCまたはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントは、一つまたは複数の特異的残基でシトルリン化されてもよく、特異的残基は、50、51、55、72、120、169、173、209、214、219、220、222残基(配列番号70から決定される残基番号)を含む群のいずれか；またはその組み合わせから選択されてもよい。シトルリン化テネイシンCまたはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントは、一つまたは複数の特異的残基でシトルリン化されてもよく、特異的残基は55、72、120、169、173、209、214、219、および220(配列番号70から決定される残基番号)を含む群のいずれか；またはその組み合わせから選択されてもよい。特異的シトルリン化残基は、CIT55、CIT209、CIT214、CIT219、および/またはCIT220を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、CIT50を含んでもよい。特異的シトルリン化残基はCIT51を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、CIT55を含んでもよい。ある実施形態において、特異的シトルリン化残基はCIT209および/またはCIT214を含んでもよい。あるいは、特異的シトルリン化残基は、CIT219および/またはCIT220を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、CIT222を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、エピトープの形態で検出されてもよい。例えば、本方法は、エピトープの検出を含んでもよく、エピトープは、CIT55、CIT209、CIT214、CIT219およびC

10

20

30

40

50

IT220から選択される少なくとも一つのシトルリン化残基；またはその組み合わせを含む。あるいは、本方法は、エピトープの検出を含んでよく、エピトープはCIT50、CIT51、CIT55、CIT209、CIT214、CIT219、CIT22およびCIT222から選択される少なくとも一つのシトルリン化残基；またはその組み合わせを含む。エピトープはシトルリン化残基CIT50を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT51を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT55を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT209を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT214を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT219を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT220を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT222を含んでもよい。

10

【0061】

サンプルは、対象由来の血液、血清、血漿、滑液および/または関節組織のサンプルであってよい。

【0062】

好ましくは、本発明の方法は、インビトロで行われる。

【0063】

対象は哺乳類であってよく、好ましくはヒトであるが、代わりにサル、類人猿、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ウサギまたはげっ歯類であってよい。

【0064】

対象の炎症性疾患の状態に関する情報は、医者、他の医療従事者、薬剤師、または他の関係者のような第三者に伝達されてもよい。当該情報は、例えば電子メール、SMS、または他のデジタル手段のような、デジタルな方法で、伝達されてもよい。

20

【0065】

本発明の別の局面によると、対象によって提供されたサンプル中の(i)シトルリン化テネインCおよび/またはシトルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメント；および/または(ii)シトルリン化テネインCおよび/またはシトルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在またはレベルを検出するための少なくとも一つの薬剤を含む、対象の炎症性疾患の状態の決定に使用するためのキットが提供される。

【0066】

好ましい実施形態において、当該キットは、対象の関節リウマチの状態を決定するために使用する。

30

【0067】

シトルリン化テネインCまたはシトルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメントの、存在またはレベルを検出/測定するのであれば、薬剤は抗体であってよい。あるいは、シトルリン化テネインCまたはシトルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在またはレベルを検出/測定するのであれば、薬剤はシトルリン化テネインC、またはシトルリン化テネインCの抗原性のフラグメントもしくはペプチドであってよい。あるいは、抗体が、シトルリン化テネインCまたはシトルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の、存在またはレベルを決定するのに使われてもよい。

40

【0068】

キットは、適切な操作上のパラメーターの説明書を、ラベルまたは折り込みの形態を含んでもよい。説明書は、使用者に、サンプルの収集方法について情報を与えてもよい。

【0069】

キットは、(i)シトルリン化テネインCおよび/またはシトルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメント；および/または(ii)シトルリン化テネインCおよび/またはシトルリン化テネインCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体、キャリブレーションおよび比較の基準として使用するサンプルを含んでもよい。キットはまた、サンプル中において検出された(i)シトルリン化テネインCおよび

50

／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または（*i i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体のレベルと、キャリブレーションサンプルまたはチャートとを比較するための説明書を含んでもよい。キットはまた、（*i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または（*i i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体のどのレベルが炎症性疾患の徴候であるかを示す説明書を含んでもよい。説明書は、いかなる（*i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または（*i i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在が炎症性疾患の徴候であることを示してもよい。

10

【0070】

よりさらなる局面によると、本発明は、対象から得られたサンプル中の（*i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または（*i i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在またはレベルの決定の、対象の炎症性疾患の状態を評価する手段としての利用を提供する。サンプルは、血液、血清、血漿、滑液および／または関節組織であってもよい。

【0071】

好ましい実施形態において、本発明は、血液または血清中の（*i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または（*i i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在またはレベルの決定の、個体における関節リウマチの状態を評価する手段としての利用を提供する。

20

【0072】

別の局面によると、本発明は（*i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または（*i i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の、炎症性疾患のバイオマーカーとしての利用を提供する。

30

【0073】

さらなる局面によると、本発明は、炎症性疾患を有する対象に対して適切な治療を決定する方法に用いられる、（*i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または（*i i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体を提供する。

【0074】

さらなる局面によると、本発明は、以下を含むアッセイを提供する：

i）患者の関節リウマチの可能性を決定するために、関節リウマチの症状を少なくとも一つ示す患者のサンプルにおいて、（*i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または（*i i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在を測定すること；および

40

i i）（*i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または（*i i*）シトルリン化テネイシンCおよび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体がサンプルに存在した場合、患者が関節リウマチの可能性があることが示唆されると結論付けること。

【0075】

本発明の該局面のアッセイは、患者のサンプル中の（*i*）シトルリン化テネイシンCお

50

よび／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または (i i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体のレベルを測定するステップ、 (i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または (i i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の測定もしくは定量した量を、基準値と比較するステップ、および (i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または (i i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の量が基準値と比較して増加していれば、対象が関節リウマチである確率が上昇していると同定するステップを含んでもよい。好ましくは、基準値は、関節リウマチでないコントロールの対象由来である。

【 0 0 7 6 】

本発明は、対象由来のサンプル中の (i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または (i i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在またはレベルを検出すること、および観察される (i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または (i i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在またはレベルに基づいた治療を行うこと、を含む対象の炎症性疾患を治療する方法を提供してもよい。

【 0 0 7 7 】

本発明のさらなる局面によると、炎症性疾患を有する対象に対する適切な治療を決定する方法が提供される。

【 0 0 7 8 】

ある実施形態において、本方法は以下のステップを含む：

(i) 対象由来のサンプルを提供すること；および
 (i i) (i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または (i i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在についてサンプルを試験すること、ここで、 (i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または (i i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の有無が、適切な治療を示唆する。

【 0 0 7 9 】

好ましい実施形態において、 (i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント；および／または (i i) シトルリン化テネイシンC および／またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在によって、有効な量の薬剤または組成物が対象に投与されるべきであることが決定する。薬剤または組成物は、抗 T N F 薬；抗 I L 1 7 治療；T細胞同時刺激修飾薬（例えばOrencia^(商標) - アパタセプト）；インターロイキン6 (I L - 6) 阻害薬（例えばActemra^(商標) - トシリズマブ）；抗 C D 2 0 抗体（例えばRituxan^(商標) - リツキシマブ）；B細胞活性化因子（例えば抗 B A F F ）；ヤヌスキナーゼ阻害薬 (J A K) （例えばTofacitinib^(商標)）；脾臓チロシンキナーゼの阻害薬 (S y k) （例えばFostamatinib^(商標)）；抗 T N C 抗体またはシトルリン化テネイシンCドメインの抗体、およびシトルリン化および／または非シトルリン化テネイシンCの生物学的活性を調節する薬剤のうちの一つまたは複数であってもよい。

【 0 0 8 0 】

本発明はまた、以下を含む、対象の炎症性疾患を治療する方法を提供してもよい；

10

20

30

40

50

- i) 対象からサンプルを取得すること；
- ii) サンプルの (i) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメント；および / または (ii) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の有無を解析すること；
- iii) (i) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメント；および / または (ii) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体が存在すれば、対象を炎症性疾患であると診断すること；および
- iv) 診断を行った対象に対して抗炎症性治療を行うこと。

10

【0081】

炎症性疾患は、本明細書に記載されている通りであってよく、例えば、関節リウマチであってよい。

【0082】

抗炎症性治療は、本発明の任意の局面または実施形態を参照して本明細書に記載されているいずれの治療であってよい。

【0083】

別の局面によると、本発明は、以下を含む、炎症性疾患の治療対象を選択する方法を提供する：

- i) 対象からサンプルを取得すること；
- ii) サンプルの (i) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメント；および / または (ii) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の有無またはレベルを解析すること；
- iii) (i) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメント；および / または (ii) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体が存在する、または正常なコントロールと比較して上昇している場合、炎症性疾患の治療対象として選択すること。

20

【0084】

さらなる局面によると、本発明は、対象の炎症状態を決定する装置を提供し、当該装置は、対象の炎症状態を示す外部信号を発することができる。好ましくは、装置は対象から取得したサンプルを受け入れることができ、サンプルの (i) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメント；および / または (ii) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の存在を解析することができる；その後、(i) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメント；および / または (ii) シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体がサンプル中に検出された場合に、外部信号を発することができる。外部信号は、可聴ノイズ、視覚変化、プリントアウト、ユーザーへのデジタルメッセージ、ユーザーまたは第三者への電子メール、または他の任意の好適なシグナルの形態であってよい。

30

40

【0085】

本発明の方法、キット、アッセイまたは装置において、シトルリン化テネイシンC および / またはシトルリン化テネイシンC の一つまたは複数のフラグメントの有無またはレベルを検出することは、一つまたは複数の特異的シトルリン化残基を含む、テネイシンC またはそのフラグメントを検出することを含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、50、51、55、72、120、169、173、209、214、219、220 および 222 残基（配列番号70から決定される残基番号）を含む群のいずれか；またはその組み合わせから選択されてもよい。あるいは、特異的シトルリン化残基は、55、72、1

50

20、169、173、209、214、219、および220残基（配列番号70から決定される残基番号）を含む群のいずれか；またはその組み合わせから選択されてもよい。特異的シトルリン化残基は、CIT55、CIT209、CIT214、CIT219および/またはCIT220を含んでもよい。特異的シトルリン化残基はCIT50を含んでもよい。特異的シトルリン化残基はCIT51を含んでもよい。特異的シトルリン化残基はCIT55を含んでもよい。ある実施形態において、特異的シトルリン化残基はCIT209および/またはCIT214を含んでもよい。あるいは、特異的シトルリン化残基は、CIT219および/またはCIT220を含んでもよい。特異的シトルリン化残基はCIT222を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、エピトープの形態で検出されてもよい。例えば、本方法は、エピトープの検出を含んでもよく、エピトープは、CIT55、CIT209、CIT214、CIT219およびCIT220から選択される少なくとも一つのシトルリン化残基；またはその組み合わせを含む。エピトープは、CIT50、CIT51、CIT55、CIT209、CIT214、CIT219、CIT220およびCIT222から選択される少なくとも一つのシトルリン化残基；またはその組み合わせを含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT50を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT51を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT55を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT209を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT214を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT219を含んでもよい。エピトープは、シトルリン化残基CIT220を含んでもよい。シトルリン化残基CIT222を含んでもよい。

【0086】

本発明の方法、キット、アッセイまたは装置において、シトルリン化テネイシンCおよび/またはシトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメントに特異性のある自己抗体の有無またはレベルを検出することは、一つまたは複数の特異的シトルリン化残基を含むエピトープに特異的親和性を持つ自己抗体を検出することを含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、50、51、55、72、120、169、173、209、214、219、220および222残基（配列番号70から決定される残基番号）を含む群のいずれか；またはその組み合わせから選択されてもよい。あるいは、特異的シトルリン化残基は、55、72、120、169、173、209、214、219、および220残基（配列番号70から決定される残基番号）を含む群のいずれか；またはその組み合わせから選択されてもよい。特異的シトルリン化残基は、CIT55、CIT209、CIT214、CIT219および/またはCIT220を含んでもよい。特異的シトルリン化残基は、CIT50を含んでもよい。特異的シトルリン化残基はCIT51を含んでもよい。特異的シトルリン化残基はCIT55を含んでもよい。ある実施形態において、特異的シトルリン化残基はCIT209および/またはCIT214を含んでもよい。あるいは、特異的シトルリン化残基はCIT219および/またはCIT220を含んでもよい。特異的シトルリン化残基はCIT222を含んでもよい。

【0087】

当業者は、本発明のいずれか一つの実施形態および/または局面の好ましい特徴が、本発明の他の全ての実施形態および/または局面に適用されうることは、理解するであろう。

【0088】

定義

「炎症」とは、組織損傷、感染、または局所免疫応答によって惹起される、体液、血漿タンパク質、および白血球の局所的蓄積という意味を含む。

【0089】

「急性炎症」とは、炎症の初期段階（initiation）および、損傷、感染または局所免疫応答の直後の、短期間で一過性の炎症性応答という意味を含む。典型的には、急性炎症は迅速に消散し、わずか数分から長くても数日の持続である。

【0090】

10

20

30

40

50

「慢性炎症」とは、持続性のおよび/または非消散性の炎症という意味を含む。慢性炎症は、しばしば健常な組織の不適切な破壊と関連している。慢性炎症は進行性であってよく、数週間もしくはそれ以上の期間を超えて続いてよい。慢性炎症は、典型的には、限定されないが、自己免疫症状を含む、持続性の感染症または疾病と関連している。

【0091】

「慢性関節炎」とは、数週間から数ヶ月の間、進行し、軽減されることなく、ヒトの疾病で観察されるように、発症している関節のゆがみを引き起こしたり、X線検査によって証明される軟骨や骨の破壊を引き起こす、持続性の炎症の意味を含む (Kelly, Harris, Ruddy and Sledge, Textbook of Rheumatology 4th Edition)。

【0092】

実験マウスモデルにおいて、慢性関節炎は、鎮静しない炎症によって特徴づけられ、比較的短期間で、不適切な組織破壊を引き起こす。慢性関節炎は、滑膜、および関節腔に炎症性細胞が長く存在すること、軟骨細胞の死、および軟骨びらんと骨びらんによって、組織学的に特徴づけられる (および同定することができる)。

【0093】

「薬剤」とは、例えばオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド模倣薬および小分子化合物のような、全ての化学物質を含む。

【0094】

「シトルリン化」とは、タンパク質中の一つまたは複数のアルギニンアミノ酸をシトルリンアミノ酸に変換することを意味する。

【0095】

「シトルリン化テネイシンCのフラグメント」または「シトルリン化テネイシンCの一つまたは複数のフラグメント」とは、シトルリン化テネイシンC由来のシトルリン化ペプチドまたはドメインを意味する。シトルリン化テネイシンCのフラグメントは、シトルリン化FBGドメイン、シトルリン化TAドメイン、シトルリン化EGF-Lドメイン、シトルリン化TNIIIドメイン、またはシトルリン化テネイシンC内の他の任意の配列であってもよい。

【0096】

「フラグメント」とは、少なくとも10個のヌクレオチドを意味し、例えば少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25個のヌクレオチドを意味する。

【0097】

「変異体」とは、ヌクレオチド配列が、少なくとも90%の配列同一性を、着目する全長配列と共有することを意味する。例えば、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性である。

【0098】

二つのポリヌクレオチドの配列同一性の割合は、好適なコンピュータープログラム、例えば、University of Wisconsin Genetic Computing GroupのGAP programを用いて決定されてもよい。また、同一性の割合は、最適に整列された配列を有するポリヌクレオチドとの関連で計算されることは、理解されるであろう。

【0099】

あるいは、アライメントは、Clustal W programを用いて実行されてもよい (Thompson et al., 1994, Nuc. Acid Res. 22:4673-4680に記載されているように)。パラメーターは、以下のように用いられてもよい:

【0100】

Fast pairwise alignmentのパラメーター: K-tuple(word) size; 1、 window size; 5、 gap penalty; 3、 number of top diagonals; 5。 Scoring method: x percent。

【0101】

Multiple alignmentのパラメーター: gap open penalty; 10、 gap extension penalty

10

20

30

40

50

; 0.05。

【0102】

Scoring matrix: BLOSUM。

【0103】

あるいは、BESTFIT programが、局所的な配列アライメントを決定するのに用いられてもよい。

【0104】

「抗体」とは、実質的に完全な抗体分子と同様に、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体（天然のヒト抗体と比較して、少なくとも一つのアミノ酸が変異している）、単鎖抗体、二重特異性抗体、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗体重鎖および/または軽鎖のホモ二量体およびヘテロ二量体、および抗原結合フラグメントおよびそれらの誘導体を含む。

10

【0105】

「自己抗体」とは、対象自身の一つまたは複数のタンパク質に対して、対象の免疫系によって生産された、任意の抗体を意味する。

【0106】

「自己抗原」は自己抗体の産生を刺激する、内在性の抗原である。

【0107】

「抗原結合フラグメント」とは、シトルリン化テネイシンCに結合可能な、抗体中の機能的フラグメントを意味する。

【0108】

「対象」とは、ヒトを含む全ての動物を意味する。対象の例には、ヒト、ウシ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、およびブタが含まれる。「患者」という用語は、治療の必要がある疾患を有する対象を意味する。

20

【0109】

本明細書で用いられる「治療的に有効な量」、または「有効な量」、または「治療的に有効な」、という用語は、一定の症状および投与計画に対して治療効果を与える量のことを指す。本用語は、必要な添加剤および希釈剤、すなわち担体または投与媒体とともに期待される治療効果を生み出すために算出された有効物質 (active material) の所定量のことである。さらに、本用語は、活性、機能およびホストの応答において、臨床的に重要な不足を減らす、かつ、最も好ましくは、回避する上で十分な量を意味している。あるいは、治療的に有効な量は、ホストの臨床的に重要な症状を改善する上で十分である。当業者には理解されることであるが、化合物の量は、その特異的な活性に応じて変化してもよい。好適な投与量は、必要な希釈剤とともに期待される治療効果を生み出すために算出された有効組成物の所定の量を含んでもよい。本方法および本発明の組成物の製造のための使用において、有効成分の治療的に有効な量が提供される。治療的に有効な量は、通常の熟練した医療従事者または獣医従事者が、当業界ではよく知られているように、患者の特性、例えば年齢、体重、性別、症状、合併症、他の疾病など、に基づいて決定することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0110】

本発明の局面を例示する実施例は、以下の図面を参照して、本明細書に記載されている：

40

【図1】テネイシンC欠損マウスにおける、急性炎症の迅速な消散。(a) ギイモサン注射後の経時の野生型マウス (+ / +) (白いバー) およびテネイシンC欠損マウス (- / -) (黒いバー) における脚の腫れ。データは、注射前の脚の直径と比較した脚の直径の増加の平均値 + / - SEMとして表している (遺伝子型当たり n = 24 のマウス)。* * = p < 0.01。(b - e) ヘマトキシリンかつエオシン (b、d) およびサフラニン - O (c、e) で染色した、ギイモサン注射4日後の、野生型マウス (b、c) およびテネイシンC欠損マウス (d、e) 由来の足首関節の代表的な切片。ボックスは、関節滑膜 (s) および軟骨プロテオグリカン (cp) を強調している。倍率 × 10。野生型マウス

50

(白いバー)およびテネインC欠損マウス(黒いバー)由来の、ザイモサン注射4日後の膝関節における、関節炎(f)および軟骨細胞死(g)の定量。データは平均値(+/-SD)として表している(遺伝子型当たりn=24のマウス)。* = p < 0.05。

【図2】テネインC欠損マウスにおいて、抗原注射により、滑膜炎が誘導される。(a-b、g)偽注射した野生型マウスの膝関節の代表的な切片。(c-f、h-i)mBSAの関節内注射24時間後の、野生型マウス(c、d、h)またはテネインC欠損マウス(e、f、i)の膝関節の代表的な切片。野生型マウスおよびテネインC欠損マウスの両方の、囊、半月板、および関節腔の炎症性細胞の浸潤は、それぞれ(cap)、(M)および(J)によって、強調されている。(S)は、骨表面全体に沿って1-3細胞のみの厚さの、偽注射されたマウスの健全な滑膜を強調しており、(ST)は有意に厚みを増した野生型マウスおよびテネインC欠損マウス両方の滑膜を強調している。切片は、ヘマトキシリンかつエオシン(a、c、e、g、h、i)およびサフラニン-O(b、d、f)で染色している。倍率x10(a-f)またはx40(g-i)。(遺伝子型当たりn=5のマウス)。

【図3】滑膜炎は、テネインC欠損マウスにおいて、迅速に鎮静する。mBSAの関節内注射3日後の、野生型マウス(a、b、f)またはテネインC欠損マウス(c、d、e)の膝関節の代表的な切片。(a、c)直線は、テネインC欠損マウスと比較した野生型マウスにおける囊の炎症の増加を強調している。(b、d)(cp)は、テネインC欠損マウスと比較した野生型マウスにおける、軟骨プロテオグリカンの損失の増加を強調している。(e、f)有意な滑膜肥厚(直線)、関節腔での細胞およびフィブリンの沈着(矢印)、およびパヌスの浸潤(矢じり)が、テネインC欠損マウスと比較して野生型マウスにおいて、観察される。切片は、ヘマトキシリンかつエオシン(a、c、e、f)およびサフラニン-O(b、d)で染色している。倍率x10(a-d)またはx20(e-f)。(遺伝子型当たりn=5のマウス)。

【図4】テネインC欠損マウスは、抗原が関節炎を誘導している間、組織破壊から保護されている。(a-b)ヘマトキシリンかつエオシン(a)およびサフラニン-O(b)で染色した、mBSAの関節内注射7日後の、野生型マウスの膝関節の代表的な切片。倍率x10。(遺伝子型当たりn=24のマウス)。矢じりは、骨びらんの領域を強調している。矢印は、関節軟骨へのパヌス浸潤を強調している。(c-d)ヘマトキシリンかつエオシン(c)およびサフラニン-O(d)で染色した、mBSAの関節内注射7日後のテネインC欠損型マウスの膝関節における代表的な切片。倍率x10。(遺伝子型当たりn=24のマウス)。Jは関節腔を強調し、ACは損傷のない関節軟骨を強調している。(e)mBSAの注射24時間後、3日後、7日後の、野生型マウス(白いバー)およびテネインC欠損マウス(黒いバー)由来の膝関節炎の組織学的なスコア。データは、平均値+/-SDを表している。(遺伝子型当たりn=5(24時間後、3日後)または遺伝子型当たりn=24(7日後))。(f)mBSAによる注射後の、野生型マウス(白いバー)およびテネインC欠損マウス(黒いバー)由来膝関節の、軟骨細胞死、軟骨表面びらんおよび骨びらんの定量。軟骨細胞死は24時間後、3日後、および7日後で示しており、軟骨表面びらんおよび骨びらは、7日後で示している。データは、平均値+/-SDを示している(遺伝子型当たりn=5(24時間後、3日後)または遺伝子型当たりn=24(7日後))。

【図5】テネインCは、初代ヒトマクロファージおよびRA滑膜繊維芽細胞において、TNF- α 、IL-6およびIL-8合成を誘導する。(a-b)初代ヒトマクロファージ(a)およびRA滑膜繊維芽細胞(b)を、24時間に渡って、刺激しないか(添加なし)、LPS(1ng/ml(a)または10ng/ml(b))で刺激するか、または組換えテネインC(1.0 μ M-1.0nM)で刺激した。示したデータは、代表的な三つの実験の一つからの3回の値の平均値(+/-SD)である。(c)初代ヒトマクロファージを、24時間に渡って、刺激しないか(添加なし)、LPS(1ng/ml)で刺激するか、組換えテネインC(1.0 μ M)で刺激した。(-)は、細胞を培地のみとプレインキュベートしたことを示す。(P)細胞を、刺激の前に、25 μ g/mlポ

10

20

30

40

50

リミキシンBで30分、プレインキュベートした。(H)添加なしの培地、または細胞に添加する前に15分間沸騰させたLPSまたはテネイシンCを含む培地とともに、細胞を培養した。データは、代表的な三つの実験の一つからの3回の値の平均値(+/-SD)である。

【図6】テネイシンCのFBGドメインは、インビボおよびインビトロにおいて、サイトカイン合成の刺激を媒介する。(a)初代ヒトマクロファージを、刺激しなかった(添加なし)、またはLPS(1ng/ml)、組換えテネイシンC(TNC)、または1.0μMテネイシンCドメイン(TA、EGF-L、TNIIII1-5、TNIIII1-3、TNIIII3-5、TNIIII5-7、TNIIII6-8およびFBG)で24時間刺激した。示したデータは、代表的な三つの実験の一つからの3回の値の平均値(+/-SD)である。(b)RA滑膜細胞を、刺激しなかった(添加なし)、またはLPS(10ng/ml)もしくは組換えFBG(1.0-0.01μM)で24時間刺激した。示したデータは、5人の異なる患者の非刺激細胞と比較した、サイトカインレベルの平均%の変化である。(c-h)PBS(c-e)または1μgFBG(f-h)の関節内注射3日後の、野生型マウスの膝関節の代表的な切片。切片は、ヘマトキシリンかつエオシン(c、d、f、g)またはサフラニン-O(e、h)で染色した。倍率×10(c、f)または×25(d、e、g、h)(遺伝子型当たりn=5マウス)。(i)PBS(黒いバー)または1μgFBG(白いバー)による関節内注射3日後の野生型マウス膝関節における、関節炎、骨びらん、軟骨表面びらんおよび軟骨細胞死の定量。データは、平均値+/-SDを表している(遺伝子型当たりn=5)。

【図7】サイトカイン合成を媒介するFBGは、MyD88依存性である。(a)ヒトRA滑膜繊維芽細胞は、感染させなかった、またはGFPのみを発現するアデノウイルス(AdGFP)で感染させた、またはドミナントネガティブなMyD88を発現するアデノウイルス(AdMyD88dn)で感染させた。細胞は、刺激しなかった、またはLPS(10ng/ml)で、またはFBG(1μM)で24時間刺激した。示したデータは、三つの独立した実験の平均値(+/-SEM)である。(b)野生型(+/+)またはMyD88欠損(-/-)マウスから単離したマウス胚線維芽細胞は、刺激しなかった(-)、またはPAM3(100ng/ml)、LPS(100ng/ml)、TNF(100ng/ml)、IL-1(5ng/ml)およびFBG(1μM)で24時間刺激した。示したデータは、三つの独立した実験の平均値(+/-SEM)である。

【図8】サイトカイン合成を媒介するFBGは、TLR4依存性であるが、CD14またはMD-2を必要としない。(a)初代ヒトマクロファージは、刺激前の30分間、培地のみと、またはTLR2(10μg/ml)、TLR4(25μg/ml)に対する機能遮断抗体もしくはアイソタイプコントロール抗体(25μg/ml)を含む培地と、プレインキュベートした。細胞は、刺激しなかった、または、LPS(1ng/ml)、FBG(1μM)もしくはPAM3(10ng/ml)で24時間刺激した。示したデータは三つの独立した実験の平均値(+/-SEM)である。(b)野生型、TLR2(TLR2-/-)またはTLR4(TLR4-/-)欠損マウスから単離したマウス胚線維芽細胞は、刺激しなかった、またはPAM3(100ng/ml)、LPS(100ng/ml)、IL-1(5ng/ml)およびFBG(1μM)で24時間刺激した。示したデータは、三つの独立した実験の平均値(+/-SEM)である。(c)野生型、TLR2(TLR2-/-)またはTLR4(TLR4-/-)欠損マウスから単離した骨髄由来マクロファージは、刺激しなかった、またはPAM3(100ng/ml)、LPS(100ng/ml)もしくはFBG(1μM)で24時間刺激した。示したデータは三つの独立した実験の平均値(+/-SEM)である。(d)ヒトマクロファージは、LPS(1ng/ml)、FBG(1μM)またはPAM3(10ng/ml)で24時間刺激する前に、阻害薬なしで、または1μg/mlmsbBLPS並びに10μg/ml抗CD14抗体で30分プレインキュベートした。示したデータは、三つの独立した実験の平均値(+/-SEM)である。

【図9】ザイモサン注射後の経時での、脚の腫脹。非注射テネイシンC欠損マウスの脚

(a、 e) (直径 1 . 6 mm)、テネイシン C 欠損マウスのザイモサン注射 2 4 時間後の脚 (d、 f) (直径 2 . 5 mm) および 4 日後の脚 (b、 h) (直径 1 . 7 mm)、および野生型マウスのザイモサン注射 4 日後の脚 (c、 g) (直径 2 . 1 mm) の代表的な画像。

【図 1 0】組換えタンパク質の合成。(a) アセンブリドメイン (T A)、1 4 個半の E G F 様リピート (E G F - L)、1 7 個のフィブロネクチンタイプ I I I 様リピート (T N I I I) (8 個の恒常的に発現されたリピート (1 - 8) および 9 個の選択的にスプライシングされ得るリピート)、およびフィブリノーゲン様グロブ (F B G) を含む、複数のドメインを含有するテネイシン C モノマーのドメイン構造。(b) 合成された組換えタンパク質によってカバーされる領域、対応するアミノ酸残基、および各タンパク質の分子量。

10

【図 1 1】タンパク質の純度の解析。還元条件下で S D S - P A G E により解析された、各組換えタンパク質 1 μ g を示す、銀染色ゲル。レーン: 1 (T A)、2 (E G F - L)、3 (T N I I I 1 - 5)、4 (T N I I I 5 - 7)、5 (T N I I I 6 - 8)、6 (T N I I I 1 - 3)、7 (T N I I I 3 - 5) および 8 (F B G)。

【図 1 2】F B G が媒介する関節炎は、インビボにおいて T L R 4 の発現を必要とする。1 μ g F B G の関節内注射 3 日後の T L R 2 (a) および T L R 4 (b) 欠損マウスの膝関節における代表的な切片。切片は、ヘマトキシリンかつエオシンによって染色している。倍率 \times 1 0 (遺伝子型当たり n = 5 マウス)。(c) 1 μ g F B G の関節内注射 3 日後の、T L R 2 (白いバー) および T L R 4 (黒いバー) 欠損マウスの膝関節における、関節炎、骨びらん、軟骨表面びらんおよび軟骨細胞死の定量。データは、平均値 + / - S D (遺伝子型当たり n = 5) を表している。

20

【図 1 3】ヒトテネイシン C およびそのドメインのアミノ酸配列 [配列番号 6 5 - 6 7]。

【図 1 4】ヒトテネイシン C のヌクレオチド配列 [配列番号 6 8]。

【図 1 5】特異的な F B G ペプチドに应答する、T N F 合成。添加なしまたは 1 0 0 μ M の各 F B G ペプチド (P 1、P 3 - P 9) で 2 4 時間培養した、R A 膜培養物による T N F 合成。

【図 1 6】様々な濃度の特異的 F B G ペプチドに应答する、T N F および I L 8 合成。添加なしまたは 2 5、1 0 0 もしくは 2 5 0 μ M の F B G ペプチドで 2 4 時間培養した、R A 膜培養物による、T N F および I L 8 合成。

30

【図 1 7】L P S、F B G ドメイン全体、または特異的 F B G ペプチドに应答する、I L 8 合成。添加なし、1 n g / m l の L P S、1 μ M の F B G ドメイン全体 (F B G)、または 1 もしくは 2 0 μ M の F B G ペプチド (P 1、P 3 - P 9) で 2 4 時間培養した後の、マクロファージによる I L 8 の合成。

【図 1 8】F B G ペプチドとのプレインキュベーション後の、L P S および F B G に应答する I L 8 および T N F 合成。2 0 μ M の F B G ペプチドによるプレインキュベーションを伴って、または伴わず、添加なし、1 n g / m l の L P S、または 1 μ M の F B G ドメイン全体 (F B G) で 2 4 時間培養した後の、マクロファージによる T N F および I L 8 の合成。

40

【図 1 9】テネイシン C を標的とした s i R N A に应答する、I L 8 および T N F の合成。ルシフェラーゼ特異的 s i R N A (コントロール)、またはテネイシン C を標的とする s i R N A : オリゴ 1 (s i 1)、オリゴ 2 (s i 2) または オリゴ 1 + 2 の組み合わせ (s i 1 + 2) によって形質転換された R A 繊維芽細胞における、テネイシン C m R N A のレベル。1 0 n g / m l の L P S の有無での、ルシフェラーゼ s i R N A (コントロール)、またはテネイシン C 標的オリゴ 1 + 2 (s i R N A) の組み合わせによって 2 4 時間形質転換された R A 繊維芽細胞における、I L 6 合成。

【図 2 0】精製したフィブリノーゲンおよび F B G は、インビトロでシトルリン化できる。精製したフィブリノーゲン (レーン 2 - 5) および F B G (レーン 6 - 9) を示すクマシー染色ゲル。(レーン 2、6) は修飾されておらず、(レーン 3、7) はシトルリン

50

化バッファー、PADおよびCaClと培養することによってシトルリン化されている。フィブリノーゲンのシトルリン化は、タンパク質の分子量の増加を観察することによって確認した。しかしながら、FBGのサイズの変化は、ほとんど見られなかった。CaCl非存在下でPADとタンパク質を培養すること、またはPAD非存在下でCaClとタンパク質を培養することは、タンパク質のサイズに影響を与えなかった(レーン4、5および8、9)。

【図21】精製した全長テネイシンCはインビトロでシトルリン化できる。修飾されていない精製全長テネイシンC(レーン9)またはシトルリン化バッファー、PADおよびCaClで培養することによってシトルリン化された精製全長テネイシンC(レーン6)を示す、クマシー染色ゲル。テネイシンCのシトルリン化は、当該タンパク質の分子量の増加を観察することによって確認した。CaCl非存在下でPADとテネイシンを培養すること、またはPAD非存在下でCaClとテネイシンを培養することは、タンパク質のサイズに影響を与えなかった(レーン7、8)。精製フィブロネクチンは、ローディングコントロールとして、含まれた(レーン2)。

【図22】FBGおよびテネイシンCのシトルリン化の、ウエスタンブロットによる確認。AMC検出キットを用いて探索した、天然およびシトルリン化テネイシンC(レーン8、9)と、天然およびシトルリン化FBG(レーン4、5)のウエスタンブロット。天然およびシトルリン化フィブロネクチン(レーン2、3)と、天然およびシトルリン化フィブリノーゲン(レーン6、7)と、天然およびシトルリン化エノラーゼ(レーン11、10)とは、シトルリン化されていることが明らかであるポジティブコントロールとして組み入れた。

【図23】FBGはインビトロでPADによってシトルリン化される。精製した組換えFBGを、シトルリン化バッファー(100mM Tris pH7.4、10mM CaCl₂、5mM DTT)中で、複数の濃度(タンパク質1mg当たり、2、7および20ユニット)のウサギPAD2、ヒトPAD2およびヒトPAD4と、37で3時間、8時間、および24時間培養することによって、インビトロでシトルリン化させた。ネガティブコントロールとして、FBG-Cを、カルシウム非存在下で(-Ca²⁺)、または酵素非存在下で(-PAD)、シトルリン化バッファー中で培養した。(A)各サンプル1μgは、SDS-PAGE上で分離し、クマシーブルーで染色した。PADによりシトルリン化されたFBGは、非シトルリン化FBGより、わずかに大きい分子量の位置に移動した。(B)タンパク質はニトロセルロース膜に移され、化学修飾ミックス(0.0125% FeCl₃、2.3M H₂SO₄、1.52M H₃PO₄、0.25M 酢酸、0.25% 2,3-ブタンジオンモノオキシム、0.125% アンチピリン)中で培養した。シトルリン化タンパク質は、抗修飾シトルリン特異的抗体によって検出した。

【図24】シトルリン化は、FBGによって刺激されるサイトカイン産生を増強する。初代マクロファージにおけるTNF合成を、刺激しないか(UN)、または0.1-1.0μM非シトルリン化FBG(nFBG)もしくはシトルリン化FBG(cFBG)で刺激した。シトルリン化バッファーのみ(CIT)、およびバッファーとPAD(CIT+PAD)を、コントロールとして組み入れた。PAD非存在下でシトルリン化バッファーと培養したFBGまたは、カルシウム非存在下でPADと培養したFBGは、シトルリン化されず、またサイトカイン合成の増強を示さなかった(非掲載)。

【図25】ウエスタンブロットにおいて、50人のRA患者のうち10人(20%)がシトルリン化テネイシンCに反応し、50人の健常対象は誰もシトルリン化テネイシンCに反応しない。(A)天然(nTNC)およびシトルリン化(cTNC)精製ヒト組換えテネイシンCのクマシー染色ゲル(上図)。AMC(抗修飾シトルリン)キットによるウエスタンブロットによって証明された、テネイシンCのシトルリン化(下図)。(B)RA患者(RA)または健常対象(NH)由来の血清で探索された、代表的なcTNCのウエスタンブロット(n=50)。nTNCのプロットにおいては、いずれの血清でも、反応性は観察されなかった(非掲載)。

【図26】RA患者のサブセット由来の血清は、citTNCに反応性を示す。異なる

10

20

30

40

50

7人のRA患者由来の血清で探索した、cTNFのウエスタンブロットであり、一人の陽性患者を示す(レーン4)。

【図27】RA患者のサブセット由来の血清は、citTNFに反応性を示す。さらに8人のRA患者由来の血清で探索した、cTNFのウエスタンブロットであり、一人の陽性患者を示す(レーン4)。

【図28】健常対照由来の血清は、citTNFに反応性を示さない。異なる8人の健常対照由来の血清で探索した、cTNFのウエスタンブロットであり、陽性患者を示さない。

【図29】シトルリン化テネイシンCに加えてシトルリン化FBGに反応するRA血清を示す。cFBGを加えたcTNFのウエスタンブロットを、同じウェルで一緒に行い、異なる7人のRA患者由来の血清で探索した。全長テネイシンC(320kD)に反応するがFBGには反応しない患者サブセット(レーン4、5)または、citFBG(27kd)に反応するが全長テネイシンCには反応しない患者(レーン6)が観察された。

【図30】LC-MS/MSによるシトルリン化部位の明確化。(A)rPAD2(丸)、hPAD2(四角)およびhPAD4(三角)によってシトルリン化されたアルギニン残基は、LC-MS/MSによって決定した。シトルリン化部位は下線を引き、非シトルリン化部位は破線を引き、LC-MS/MS解析によって網羅されなかった部位は、*で印をつけている。(B)FBGドメインの配列。全てのアルギニン残基を示している。シトルリン残基に変換されたアルギニン残基は下線を引いている。*で印をしたアルギニンは、LC-MS/MS解析で網羅されなかった残基である。

【図31】シトルリン化抗体エピトープの同定。(A)FBGのアミノ酸配列に対応する配列を持つペプチドは、アミノ末端およびカルボキシ末端へのシステイン残基の付加、およびLC-MS/MSによって同定されたアルギニン残基のシトルリン残基への変換によって、設計した。(B)関節リウマチ患者(RA; n=20)および健常対照(n=20)における、シトルリン化FBGペプチドおよびアルギニン含有コントロールペプチドに対する、IgG応答。コントロール血清の第95百分位数が陽性を決定するために使用された(破線)。グループ間の差異に対してp値を計算するために、マンホイットニーU検定が用いられた。(n.s.=有意差なし、* = p < 0.05および** = p < 0.01、*** = p < 0.001、**** = p < 0.001)

【図32】FBGのシトルリン化は、ヒト皮膚繊維芽細胞(HDF)および滑膜繊維芽細胞(RAF)の細胞接着を減らす。(A)インテグリン α 3に結合すると同定された配列は、白で示している(Yokoyama et al., 2000)。本配列中で、二つのアルギニン(黒で示す)は、シトルリン化されていると同定された。(B)96穴プレートのウェルを、複数の濃度の、FBG、シトルリン化FBG(cFBG)、カルシウム非存在下のバッファーで培養されたFBG(FBG-Ca²⁺)、またはPAD非存在下で培養されたFBG(FBG-PAD)で覆った。ポジティブコントロールとして、ウェルはフィブロネクチン(FN)(1 μ g/ml)で覆い、BSA(10mg/ml)で覆ったウェルはネガティブコントロールとして使用した。プレートを、RA患者由来のHDFまたはRAFと一緒に45分培養し、クリスタルバイオレット(0.1%)で染色後に接着細胞の吸収を測定することによって、接着を測定した。データは、少なくとも4つの独立した実験の平均値+s.e.m.として示している。* = p < 0.05、** = p < 0.01。

【実施例】

【0111】

実施例1 - 一般的な方法

試薬

ザイモサン、メチル化BSA並びにフロイント完全アジュバント、抗FLAG M2抗体(マウスモノクローナル抗体)、プラストサイジン、およびアイソタイプコントロール抗体(マウスIgG2a、IgG1)は、Sigma-Aldrich(Dorset,UK)から購入した。Hypnormは、VetaPharma Ltd.(Leeds,UK)から購入した。リムルスアメボサイトライゼートアッセイは、Associates of Cape Cod(Liverpool,UK)から入手した。野生型ヒト胎児腎

10

20

30

40

50

臓 (HEK 293 - EBNA) 細胞は、Invitrogen (Groningen, Netherlands) から入手した。M - CSF およびマウス IL - 1 は、PeproTech (Neuilly-Sur-Seine, France) から入手した。DMEM、RPMI 1640、ウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリン/ストレプトマイシン、抗菌 - 抗真菌溶液 PSA および -メルカプトエタノールは、PAA Laboratories (Yeovil, UK) から入手した。ヒト TLR 2 および TLR 4 / CD 14 / MD - 2 を安定して発現する HEK 293 細胞株、ポリミキシン B、msbBLPS および機能遮断 TLR 2 (クローン: TL 2 . 1 アイソタイプ: マウス Ig G 2 a) および TLR 4 抗体 (クローン: HTA 125 アイソタイプ: マウス Ig G 2 a) は、Invivogen (Calne, UK) から入手した。フェノールクロロホルム精製した、大腸菌 (*Escherichia coli*) リポ多糖 (LPS) (粗面および滑面) および、Pam3Cys - Ser - Lys 4 (Pam3C) は、Alexis (Birmingham, UK) から入手した。マウス TNF - および IL - 1 受容体アンタゴニスト (IL-1ra-IL-1F3) は、R&D Systems (Abingdon, UK) から入手した。機能遮断抗 - CD 14 抗体 (アイソタイプ: マウス Ig G 1) は、Abcam (Cambridge, UK) から入手した。ヒトまたはマウスの TNF - 、IL - 6、および IL - 8 ELISA は、Pharmingen (Oxford, UK) から入手した。

10

20

30

40

50

【0112】

全長テネイシン C の精製

サイトカイン産生が、LPS や LPS 関連分子のような、細菌の夾雑物に起因しないことを保証するために、(Lange (2007)) に記載されたように、His タグ付きのヒトテネイシン C を組み入れた pCEP-pu ベクターを遺伝子導入された哺乳類細胞株 HEK 293 のならし培地より、組換え全長ヒトテネイシン C を精製した。テネイシン C は、(Lange (2007)) に記載されたように均一に精製され、製造業者の使用説明書に従いリムルスアメボサイトライセートアッセイを用いて、LPS のコンタミネーションがないことを決定した。

【0113】

組換えタンパク質の合成

テネイシン C の各ドメインに対応するタンパク質 (TA、EGF - L、複数の TN I I I リピートおよび FBG) を合成して、精製した。実施例 2 参照。

【0114】

組換えタンパク質の LPS によるコンタミネーションの測定

各組換えタンパク質の LPS のレベルを確認するために、リムルスアメボサイトライセートアッセイを製造業者の使用説明書に従って用いた (感度は、タンパク質 1 mg 当たり、 $\sim 0.7 \pm 0.5$ pg の LPS)。本研究で用いた全ての組換えタンパク質は、10 pg / ml より少ないレベルの LPS であった。

【0115】

アデノウイルスベクターおよびその増殖

野生型 MyD88 (AdMyD88wt)、ドミナントネガティブな MyD88 (AdMyD88dn) および GFP コントロール (AdGFP) をコードする、複製欠損アデノウイルス組換えベクターは、社内で構築した。当該ウイルスの合成については、in Andreakos (2004) に記載されている。本研究で用いた全てのウイルスは、E1 / E3 欠損で、Ad5 血清型に属する。ウイルスは 293 ヒト胎児腎臓細胞で増殖され、二つの塩化セシウム勾配による超遠心分離法で精製し、ウイルスの力価を、既に記載されているように (Sacre (2007))、ブランクアッセイで測定した。

【0116】

動物

Saga (1992) によって記載された元の系統であり、白い腹部とアゴーチの毛色のバックグラウンドを持つ近交系マウスの 129 / sv 由来の、ホモテネイシン C 欠損マウスは、Prof. Charles French-Constant (University of Edinburgh, UK) から提供された。年齢を適合させた、コンジェニックの近交系野生型 129 / sv マウスは、Charles River (Margate, UK) から入手した。全てのテネイシン C 欠損マウスおよび野生型 129 / sv

v マウスは、雄であり、実験時に 8 - 10 週齢であった。

【0117】

C57BL/6 バックグラウンド (黒い毛色の近交系マウス) のホモ TLR2 および TLR4 欠損マウスは、B&K Universal (Hull, UK) Hoshino (1999) および Takeuchi (1999) から入手した。C57BL/6 バックグラウンドのホモ MyD88 欠損マウスは、Sanger Institute (Cambridge, UK) によって提供された。年齢を適合させた、コンジュニクの近交系野生型 C57BL/6 マウスは、Charles River (Margate, UK) から入手した。マウス胚繊維芽細胞の単離のために、8 - 10 週齢の一匹の雌を、8 - 10 週齢の 2 匹の雄と交配させた。骨髄由来マクロファージを単離するために、マウスは雌であり、実験時に 10 - 12 週齢であった。

10

【0118】

全てのマウスは、標準的なげっ歯類の固形飼料および水を適宜与え、12 時間の明暗周期で、空調された環境において、おがくずで覆ったケージにいて、飼育した (< 6 マウス/ケージ)。全てのマウスの処置は、機関倫理委員会の承認を受けた。

【0119】

統計手法

平均値 (Mean)、SD、SEM、および統計検定は、GraphPad version 3 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA) を用いて計算した。複数のグループの平均値を、適当な場合に Dunnett 多重比較検定を伴う、一元配置分散分析によって解析した。独立 t 検定は、二つのグループのみを含む実験の場合に使用した。

20

【0120】

実施例 2 - 組換えタンパク質の合成

テネニン C の各ドメインに対応するタンパク質 (TA、EGF-L、複数の TNII I リピートおよび FBG) を合成し、精製した。合成した組換えタンパク質は図 9 に図示した。

【0121】

試薬

Pfu Turboポリメラーゼは、Stratagene (Amsterdam, Netherlands) から入手した。Easy mix 50 PCR tube は、Molecular Bioproducts (Lutterworth, UK) から入手した。RNeasy キットおよび Ni²⁺-NTA-アガロースカラムは、Qiagen (Crawley, UK) から入手した。pCR Blunt ベクター、pCEP4 プラスミドベクター、ヒト胎児腎臓 (HEK293-EBNA) 細胞および 4 - 12% Bis-Tris 勾配ゲルは、Invitrogen (Groningen, Netherlands) から入手した。pET32b ベクターおよび BL21 (DE3) Rosetta 細胞は、Novagen (Kent, UK) から入手した。HiTrap Q カラム、HiTrap S カラム、Sephacryl S500 HR カラムおよびヘパリンセファロースカラムは、Amersham (Buckinghamshire, UK) から入手した。

30

【0122】

制限酵素は、New England BioLabs (Hitchin, UK) から入手した。DMEM、ウシ胎児血清 (FBS) およびペニシリン/ストレプトマイシンは、PAA laboratories (Yeovil, UK) から入手した。FuGENE 6 遺伝子導入試薬は、Roche Applied Science (Basel, Switzerland) から入手した。

40

【0123】

抗 FLAG M2 抗体 (マウスモノクローナル抗体)、抗 FLAG M2 アガロース、FLAG ペプチドは、Sigma-Aldrich (Dorset, UK) から入手した。抗テトラHis 抗体 (マウスモノクローナル抗体) は、Qiagen (Crawley, UK) から入手した。アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗 (マウス IgG) IgG およびアルカリフォスファターゼの Western Blue 安定化基質は、Promega (Southampton, UK) から入手した。SDS-PAGE のための高精度なタンパク質標準物質は、BioRad (Hemel Hempstead, UK) から入手した。

【0124】

プライマー設計

50

ドメインの境界は、ヒトテネイシンC配列として公開されているアライメント (Siri (1991) アクセション番号 P 2 4 8 2 1 (Swiss-Prot)) を用いて決定した。各ドメインをクローン化するために、フォワードおよびリバースプライマーの両方において必要とされるコード配列の5'および3'末端配列に対応する18-21塩基を含む、PCRプライマーを設計した。フォワードプライマーは、コード配列の直前に、NdeI制限酵素サイトとそれに続くN末端Hisタグを含んだ。NdeIサイトの最後の3塩基は、ATCのメチオニン開始コードを形成している。リバースプライマーはpET32b発現ベクターへの一方向性のクローニングを可能にするために、コード配列の直後にTTA停止コドンとそれに続くBamHIまたはKpnIサイトを含んだ。

【表1-1】

10

タンパク質の名称	フォワードプライマー リバースプライマー
TA	FW: ATACATATGCATCATCATCATCATCATGGGG TCCTCAAG AAAGTCATCCGG [配列番号1] RV: GCCGGATCCTTAGCCTGCTCCTGCAGTACAT TG [配列番号2]
EGF-L	PCR1 FW: ACAGTGGTACCACCATGGGGGCCATGGGGGC CATGACT CAGCTGTTG [配列番号3] RV: CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCACCTTCG GTAGCGAG GGCAAG [配列番号4] PCR2 FW: GACTAGAAGGACGACGATGACAAGTGCTGTC TCCAGCC TGCCAC [配列番号5] RV: GACAGCGGATCCTTAATGATGATGATGATGA TGTGAGCA GTCTTCTCCGCTGTAGC [配列番号6]
TN1-5	FW: ATACATATGCATCATCATCATCATCATGAGG TGTCTCCTCC CAAAGA [配列番号7] RV: GCCGGTACCTTAAGTGGATGCCTTCACACGT GC [配列番号8]
TN1-3	FW: ATACATATGCATCATCATCATCATCATGAGG TGTCTCCTC CCAAAGA [配列番号9] RV: GCCGGTACCTTATGTTGTGAAGGTCTCTTTG GC [配列番号10]

20

30

40

【表 1 - 2】

TN3-5	FW: ATACATATGCATCATCATCATCATCATCGCT TGGATGCC CCCAGCCAGAT [配列番号11] RV: GCCGGTACCCTTAAGTGGATGCCTTCACACGT GC [配列番号12]
TN5-7	FW: ATACATATGCATCATCATCATCATCATGAGT TGGACACG CCCAAGGAC [配列番号13] RV: GCCGGATCCTTATGTTGTGAACTTGGCAGTG ATGGTTG [配列番号14]
TN6-8	FW: ATACATATGCATCATCATCATCATCATGCCA TGGGCTCCCC AAAGGAA [配列番号15] RV: GCCGGATCCTTATGTGGTGAAGATGGTCTGG ATCAT [配列番号16]
FBG	FW: ATACATATGCATCATCATCATCATCATATTG GACTCCTGTAC CCCTTCC [配列番号17] RV: GCCGGATCCTTATGCCCGTTTGCGCCTGCCT TCAA [配列番号18]

10

20

【0125】

前記のプライマーは全て、5'から3'に記載している。標識となる配列は太字、Hisタグ(CATCATCATCATCATCATCAT [配列番号19])は下線、制限酵素切断部位(CATATG = Nde1サイト、GGATCC = BamH1、GGTACC = Kpn1サイト)は太字の斜体で記載している。

【0126】

PCR

PCR増幅は、10 pmol / μ lの各プライマー、1 μ gの鋳型、5 μ l DMSO、および1.25ユニットのPfu Turbo polymeraseを用いて、最終容量25 μ lで行った。これを、50チューブのEasy mixに入った、バッファーおよびデオキシヌクレオチド三リン酸に添加した。全ての反応に使用した鋳型は、RNeasy kitで単離したRNAを用いて、U87MGヒトグリオーマ細胞から調整したcDNAだった。反応は、変性、アニーリング、および伸長を、それぞれ95°C、55-65°C(プライマーの融解温度(Tm)による)、および72°Cで、40サイクル繰り返した。

30

【0127】

クローニング

PCR産物は、pCR Bluntベクターに連結させ、PCRによりエラーが導入されていないかを確認するために、配列決定を行った。エラーまたはサイレント変異がないクローンを選択した。インサートは、その後、プライマー(TN5-7およびTN6-8)内に設計された制限酵素サイトNde1およびBamH1を用いて、pET32bに連結させた。ヒトテネイシンCは、TADメイン内(494の位置)およびTNIII2内(2509の位置)に、BamH1内部サイトを持っている。それゆえ、TAおよびTN1-8は、FWプライマーのNde1サイトおよびpCR BluntのクローニングサイトのKpn1サイトを用いて、クローニングした。ヒトテネイシンCは、Kpn1の内部サイトを持っていない。TN1-5、TN1-3およびTN3-5は、プライマーのNde1およびKpn1サイトを用いてクローニングした。FBGは、NdeI内部サイトを含んでおり(6439の位置)、それゆえ、Nde1およびBamH1による切断と、それに続くNde1による切断という二段階のライゲーションを用いて、クローニングした(位置は、図14で示

40

50

した、テネイシンCの全長ヌクレオチド配列内のサイトを指す)。

【0128】

細菌の増殖、誘導、および溶解

プラスミドをBL21(DE3)Rosetta細胞に形質転換し、50 μ g/mlカルベニシリンを含む3LのLB(Luria-Bertani)培地で培養し、1mMイソプロピル-D-チオガラクトピラノシドによって誘導した。3時間後、細胞を4,000rpm、20分遠心分離することによって回収し、氷冷した洗浄バッファー(50mM Tris-HCl、pH8.0、100mM NaCl、および1mM EDTA)で2回洗浄し、フレンチプレスで溶解した。インクルージョンポディーを、12,000rpm、20分、4で遠心分離して、回収した。TAおよびFBGを除いて、タンパク質は全て上清に存在した。組換えTAおよびFBGタンパク質は、6M塩酸グアニジン、50mM Tris-HCl、pH8.0、および10mM β -メルカプトエタノールを用いて、室温で2時間一定の攪拌を行うことによって、インクルージョンポディーから抽出した。

10

【0129】

細菌のタンパク質の精製

組換えタンパク質を含む溶液を、Ni²⁺-NTA-アガロースカラムにアプライし、20mMイミダゾールを含む50mM Tris-HCl、pH8.0で洗浄した。続いて、カラムを50mM Tris-HCl、pH8.0で洗浄し、タンパク質を、60mMイミダゾールを含む50mM Tris-HCl、pH8.0で溶出した。TAおよびFBGに対しては、各洗浄バッファーおよび溶出バッファーに6M塩酸グアニジンが含まれた。Niクロマトグラフィーの後、TAおよびFBGは、その後の精製を必要としなかった。TN1-3およびTN6-8はさらに、HiTrap Qカラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製され、TN1-5、TN3-5およびTN5-7は、HiTrap Sカラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製され、TN1-8はHiTrap Sカラムを用いた後Sephacryl S500 HRカラムを用いたゲル濾過を用いることによって、精製された。

20

【0130】

不溶性タンパク質のリフォールディング

TAおよびFBGは、6M塩酸グアニジンを含む50mM Tris-HCl、pH8.0で、20 μ g/mlに希釈し、その後20mMシスタミンで処理して4で16時間攪拌することによって、リフォールディングした。当該溶液を、150mM NaCl、10mM CaCl₂、5mM β -メルカプトエタノールおよび1mM 2-ヒドロキシエチルジスルフィドを含む、15ボリュームの50mM Tris-HCl、pH8.0によって424時間の透析を二回行い、20mM Tris-HCl、pH8.0によって424時間の透析を二回行い、その後4、12,000rpmで30分、遠心分離した。リフォールディングは、還元条件下および非還元条件下で、SDS-PAGEを用いて、サイズ変化を見ることによって評価した。タンパク質の活性は、TADメイン重合およびヘパリンセファロースカラムへのFBGの結合によって、確認した。

30

【0131】

哺乳類細胞を用いたEGF-Lドメインの合成

大腸菌(E.coli)発現システムを用いたEGF-Lリピート領域の発現および精製の最初の試みは、失敗に終わった。これは、当該領域にある全部で91個のシステインのために、タンパク質フォールディングの達成が困難であることに起因しうる可能性が最も高い。それゆえに、TN-CのEGF様ドメインは、HEK293細胞を用いて発現させた。

40

【0132】

二つのPCR反応を行った。一つ目のPCR産物は、KpnI制限酵素サイト、およびTN-Cシグナル配列が続くKozak配列から構成された。二つ目のPCR産物は、FLAGペプチド、並びに、ヒスチジンタグおよびBamH1制限酵素配列が続くEGF様ドメイン配列から構成された。

【0133】

50

二つのPCR産物は、Ho(1989)によって記述されたように、互いに連結された。PCR反応は、前記のように行った。構築物全体を、PCRプラントベクターにクローニングし、配列決定した。その後、pCEP4ベクターにサブクローニングした。当該DNAは、Fugeneを用いてHEK293細胞に遺伝子導入され、細胞は、10%(v/v)ウシ胚血清、ペニシリン(100unit/ml)およびストレプトマイシン(100unit/ml)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)において、ハイグロマイシン耐性(200µg/ml)として選択した。安定的に遺伝子導入された細胞由来の2リットルのならし培地を回収し(細胞を培地で培養後に回収した)、貯蔵した。貯蔵したならし培地(2リットル)は、3000rpmで遠心分離し、培地から細胞片を分離した。

【0134】

培地はその後、抗FLAGカラムにアプライされた。物質は、50mlの素通り画分にて回収された。カラムは10カラムボリュームの1M NaCl、50mM Tris-HCl、pH7.5で洗浄した後、LPSの除去を確認するために、10カラムボリュームの60%イソプロパノールで洗浄した。カラムはその後、50mM Tris-HClバッファー、pH7.5で洗浄し、最後にタンパク質を、50mM Tris-HClバッファー、pH7.5中の200µg/ml FLAGペプチドを用いて溶出した。

【0135】

タンパク質の純度の解析

各タンパク質は、1000ボリュームの150mM NaClおよび50mM Tris pH7.5で、透析した。タンパク質の純度は、還元条件下で、SDS-PAGEによって解析した。SDS-PAGEのために、1µgの精製組換えタンパク質を、4-12% Bis-Tris 勾配ゲルに流し、続いて、単一バンドであることを証明するために、ゲルを銀染色した(図10)。ウエスタンブロット解析もまた、行った。SDS-PAGEにより分離したタンパク質は、フッ化ポリビニリデン膜に電気泳動で転写した。当該膜は、トリス緩衝の生理食塩水中の5%BSAでブロックされ、その後FLAG M2を認識する一次抗体(1:2000希釈)(EGF-L)または、テトラHis抗体(1:2000)(他の全てのタンパク質)と培養した。その後、ブロットは、アルカリフォスファターゼと結合した二次抗体と培養させ、タンパク質のバンドは、Western Blue 安定化基質を用いて可視化させた。これにより、ゲルは、予想分子量(Mw)の位置に各抗体が認識する特異的な単一バンドを示す(非掲載)。

【0136】

実施例3 - 動物モデル

ザイモサン誘導関節炎

ザイモサン誘導関節炎(ZIA)は、テネイシンC欠損マウスおよび野生型マウスにおいて、Keystone(1977)に記載されたように、ザイモサン(サッカロマイセスセレビシエ(Saccharomyces cerevisiae))注射によって誘導された。ザイモサンは、1mlの滅菌PBS中に、15mgのザイモサンを溶解させて、調製した。調製した溶液は、2回沸騰させ、超音波処理した。マウスは、滅菌水で1:10に希釈した150µlのHypnormを腹腔内注射することによって麻酔をかけ、その後、ザイモサン(10µl)を右の足蹠に注射した(d=0)。

【0137】

コントロールマウスは10µlのPBSのみの注射を受けるか、または注射されなかった。肉眼での関節炎の判定のために、それぞれの後脚の厚さを毎日ノギス(microcaliper)で計測し(Kroepelin, Schluchlem, Germany)、直径は、マウスごとのそれぞれの炎症性の後脚の平均値として表した。

【0138】

実験完了後(day=4)、マウスを安楽死させ、後脚を10%(v/v)の緩衝ホルマリンドで固定し、10%EDTAで脱灰して、パラフィンで処理した。

【0139】

抗原誘導関節炎

10

20

30

40

50

抗原誘導関節炎 (AIA) は、テネイシンC欠損マウスおよび野生型マウスにおいて、すでにBrackertz (1977)によって記載されたように、誘導された。簡潔に言えば、0日目に、滅菌水で1:10に希釈した150 µlのHypnormをマウスに腹腔内注射して麻酔をかけ、その後200 µgのメチル化BSAで免疫化した。mBSAは0.2 mlのフロイント完全アジュバントに乳化させて、尾底部に皮内注射した。

【0140】

7日目に、滅菌した33-ゲージのマイクロカニューレ (33-gauge microcannula) を用いて、mBSA (10 µlの滅菌PBS中に100 µg存在)の関節内注射により、関節炎を右膝関節に誘導した。コントロールマウスは、10 µlのPBSのみの注射を受けるか、または注射されなかった。

10

【0141】

14日目に、マウスを安楽死させ、膝関節を切除し、10% (volume/volume)の緩衝ホルマリンで固定し、10% EDTAで脱灰して、パラフィンで処理した。

【0142】

F B G 注射

野生型マウスは、滅菌水で1:10に希釈した150 µlのHypnormを腹腔内注射することによって麻酔をかけ、その後、滅菌した33-ゲージのマイクロカニューレ (33-gauge microcannula) を用いて、10 µlの滅菌PBS中の100 ng、1 µgまたは3 µgのF B Gを右膝関節に注射した。コントロールマウスは、10 µlのPBSのみの注射を受けるか、または注射されなかった。

20

【0143】

3日目および7日目に、マウスを安楽死させ、膝関節を切除し、10% (volume/volume)の緩衝ホルマリンで固定し、10% EDTAで脱灰して、パラフィンで処理した。

【0144】

膝関節の組織診断

冠状の組織切片 (4 µm) を、関節の至るところから7深度で切断した; 80 µm離れており、ヘマトキシリン・エオシンまたはサフラニン-Oで染色して、関節病理を評価した。病理組織学的な変化は、Van Lent (2006)に記載されているように、次のパラメーターを使用して、点数化した。

【0145】

炎症 (炎症性細胞の滑膜への流入 (浸潤物) および関節腔への流入 (滲出物)) は、0 (炎症なし) から3 (重度の炎症) の、任意のスケールを用いて段階分けした。軟骨細胞死は、全領域との関連で、empty lacunaeを含む軟骨領域の割合で、決定された。軟骨表面びらんは、全軟骨領域との関連で、損失した軟骨の量で、決定された。骨破壊は、全膝関節切片の10個の異なる領域において、決定された。破壊は、スケール0 (損傷なし) から3 (骨の構造の完全な損失) に段階分けされた。組織学的解析は、実験群を知らされていない研究所によって、行われた。実験群の各マウスに対する平均値のスコアは、関節当たり少なくとも5切片の深度の病理学的なスコアの平均値によって、計算した。

30

【0146】

結果

40

ザイモサン誘導関節炎はテネイシンC欠損マウスにおいて持続しない

足蹠へのザイモサン注射は、マウスの急性滑膜炎を誘導するために用いられた。野生型マウスは、24時間で最大の脚直径に達する、急速な脚の腫脹を示した (最初の脚の直径の62%の増加である、2.56 mm)。これは、さらに24時間、維持された。2日後、脚の直径は減少したが、脚は4日目まで、腫脹したままであった (32%の増加である、2.08 mm) (図1a)。テネイシンC欠損マウスは、注射24時間後に、野生型マウスと同程度の脚の腫脹を示した (最初の脚の直径の57%の増加である、2.41 mm)。しかしながら、テネイシンC欠損マウスの腫脹は、野生型マウスに比べ、早く沈静した; 脚の直径は、2日で顕著に減少し、4日目に1.7 mmに減少した (わずか11%の増加) (図1a)。しかしながら、注射後4日まで、野生型マウスの脚は、依然として目

50

に見えて腫れて赤く、一方、テネインC欠損マウスの脚は、見た目には腫れても赤くもなく、注射をしていない脚に似ていた(図9)。

【0147】

この違いは4日目に組織学的に反映された。野生型マウスの滑膜は、顕著に炎症性であり、細胞浸潤を示しており、軟骨プロテオグリカンの損失が観察された(図1b、c)。対照的に、テネインC欠損マウスの滑膜は、滑膜炎、細胞浸潤、または軟骨プロテオグリカンの損失を示さず(図1d、e)、偽注射されたマウスおよび注射されていないマウスの関節に似ていた(非掲載)。関節炎の定量により、滲出物(関節腔における細胞集団)は、野生型マウスまたはテネインC欠損マウスのどちらにおいてもほとんどないが、浸潤物(滑膜層における細胞集団)のレベルは、テネインC欠損マウスにおいて顕著に減少したことが明らかになった(図1f)。どちらの遺伝子型においても、マウスにおいて軟骨びらんまたは骨びらは発症しなかったが、低レベルの軟骨細胞死が野生型マウスで起こった。テネインC欠損マウスでは、見られなかった(図1g)。従って、テネインCの発現は、急性炎症の維持を促進していると考えられる。

10

【0148】

テネインC欠損マウスは、抗原誘導関節炎の間、持続性の炎症および構造的損傷から保護されている

テネインCが、より破壊性の炎症性関節炎にもまた寄与しているかどうかを判断するために、びらん性関節炎を、mBSAによる免疫化に続く、mBSAの膝関節への関節内注射によって誘導した。当該モデルは、細胞性免疫応答および体液性免疫応答の両方を包含し、ヒトRAと同様の病理学的な変化を誘導する(Brackertz (1977))。mBSA注射は、テネインC欠損マウスおよび野生型マウスの両方において、同様の炎症性応答を誘導した。細胞浸潤および滑膜肥厚は、偽注射されたマウス(図2a、b、g)、または注射されていないマウス(非掲載)と比較したところ、両遺伝子型のマウスにおいて、24時間までに表れた(図2c-f、h、i)。

20

【0149】

しかしながら、これらの症状は、テネインC欠損マウスでは、野生型マウスのようには持続しなかった。注射後3日目までに、野生型マウスは、半月板および嚢の炎症の増加、滑膜肥厚、関節腔への細胞およびフィブリンの沈着、パンヌスの形成、局在的な軟骨プロテオグリカンの損失を示す(図3a、b、f)。対照的に、テネインC欠損マウスにおいては、3日目までに、炎症が嚢に限定され、滑膜炎は鎮静し、フィブリン/細胞集合体が関節腔に存在せず、パンヌス形成も、軟骨プロテオグリカンの損失も見られない(図3c、d、e)。

30

【0150】

7日目までに、野生型マウスは、持続性の炎症性細胞浸潤および関節腔滲出物、広範囲の滑膜炎、パンヌス形成、関節軟骨の破壊、および骨びらんを示した(図4a、b)。偽注射された膝および注射されていないマウスの膝は、健常であり、炎症も関節破壊も示さなかった(非掲載)。テネインC欠損マウスはまた、軽度の炎症性細胞浸潤のみ示し、関節腔滲出物、滑膜炎、パンヌス形成、関節軟骨の破壊、または骨びらんを示さない、健常な関節であった(図4c、d)。偽注射された、および/または注射されていないテネインC欠損マウス由来の関節もまた、健常であった(非掲載)。

40

【0151】

これらの組織学的なデータは、材料と方法に記載されたように、関節疾病の点数化に反映させる。注射24時間後の、野生型マウスおよびテネインC欠損マウスの両方で観察された細胞浸潤物および滲出物のレベルは、顕著に異なっていた。しかしながら、細胞集団が野生型マウスにおいて経時的に増加し続けた一方、テネインC欠損マウスにおける当該応答は減弱化し、関節の細胞数は経時的に減少した(図4e)。野生型マウスの軟骨において、経時的にますます高レベルの軟骨細胞死が生じたが、テネインC欠損マウスにおいて顕著な軟骨細胞死は見られなかった(図4f)。24時間、または3日目において、軟骨表面びらんおよび骨びらは、野生型マウスにおいて明白ではなかった

50

が（非掲載）、7日目までに、顕著な組織破壊が生じた。対照的に、テネイシンC欠損マウスは、24時間、3日目（非掲載）、または7日目（図4f）に、組織破壊を示さなかった。これらのデータは、野生型マウスとは異なり、テネイシンC欠損マウスにおいて関節炎の開始（滑膜および関節腔への細胞流入）は影響を受けず、疾病が組織破壊および細胞死まで進行していないことを示している。これらの結果は、テネイシンCの発現が、当該モデルにおいて持続性の滑膜炎および関節破壊に必要であることを証明する。

【0152】

実施例4 - 細胞培養

患者の検体

ヒト単核球は、末梢血液（London Blood Bank）から単離され、マクロファージは、既に記載されている通り（Foxwell（1998））、100ng/mlのM-CSFで4日間分化後の単核球に由来した。

【0153】

RA膜細胞（全ての滑膜細胞型の混合群を表す）は、既に記載されている通り（Brennan（1989））、関節置換手術を受けた患者から取得した滑膜から単離された。RA滑膜繊維芽細胞は、既に記載されている通り（Brennan（1989））、RA膜細胞の混合群から単離された。本研究は、地域の信頼のおける倫理委員会（Riverside NHS Research Committee）によって承認され、廃棄組織（関節置換手術後の滑膜）は、署名されたインフォームドコンセントを患者から受け取り、患者の身元を保護するために匿名化した後にのみ、入手した。

【0154】

単離した直後、RA膜細胞およびマクロファージは、刺激前の24時間、96穴組織培養プレートにおいて、10%（v/v）FBSおよび100U/ml（ユニット/ml）ペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI 1640中にて、ウェル当たり 1×10^5 個の細胞で培養した。滑膜繊維芽細胞（継代数2または3のみ使用される）は、刺激前の24時間、96穴組織培養プレートにおいて、10%（v/v）FBSおよび100U/mlペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM中にて、ウェル当たり 1×10^4 個の細胞で培養した。

【0155】

マウス胚線維芽細胞（MEF）および骨髄由来マクロファージ（BMDM）

MEFは、マウスの全9個のTLRのmRNAを高レベルで発現し、TLRリガンドの活性化に特異的かつ高度に応答する。TLR2、TLR4およびMyD88を標的とした欠失を有するマウス由来のMEFは、特異的リガンドに対するIL-6応答において重度の欠損を示す（Kurt-Jones（2004））。MEFは、年齢を適合させた、妊娠中の雌の、野生型マウス、TLR2およびTLR4欠損マウスから回収した13日目の胚から単離した（Todaro（1963）に記載されたように）。繊維芽細胞は、刺激前の24時間、96穴組織培養プレートにおいて、10%（v/v）FBSおよび100U/mlペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM中にて、ウェル当たり 2×10^4 個の細胞で培養した。

【0156】

BMDMは、年齢を適合させた雌の、野生型マウス、TLR2およびTLR4欠損マウスの大腿骨を吸引して（Butler（1999）に記載されたように）、DMEM、20%（v/v）FBS、10ml/L（v/v）抗菌抗真菌溶液PSA、50μM -メルカプトエタノールおよび10ng/ml M-CSFで7日間細胞を培養することによって、導き出された。その後、マクロファージは、刺激前の24時間、96穴組織培養プレートにおいて、DMEM、20%（v/v）FBS、10ml/L（v/v）抗菌抗真菌溶液PSA、50μM -メルカプトエタノール中にて、ウェル当たり 1×10^5 個の細胞で培養した。

【0157】

HEK293細胞株

TLR2およびTLR4/CD14/MD-2を発現するHEK293細胞株は、刺激

10

20

30

40

50

前の24時間、96穴組織培養プレートにおいて、10% (v/v) FBSおよび10 μg/ml プラズマサイジンを含むDMEM中にて、ウェル当たり1 × 10⁴ 個の細胞で培養した。

【0158】

細胞刺激およびサイトカイン合成の評価

細胞は、示された容量のテネイシンCおよび組換えテネイシンCフラグメント(1.0 μM - 1.0 nM)と共に、24時間37 °Cで培養した。細胞はまた、記載がある場合、LPS(ヒトマクロファージに対しては1 ng/ml、ヒト繊維芽細胞およびHEKに対しては10 ng/ml、MEFSおよびBMDMに対しては100 ng/ml、およびHEKSに対しては10 ng/ml)、PAM3(ヒトマクロファージ、ヒト繊維芽細胞、およびHEKに対しては10 ng/ml、MEFおよびBMDMに対しては100 ng/ml)、マウスIL-1(MEFSに対しては5 ng/ml)およびマウスTNF-α(MEFSに対しては100 ng/ml)で刺激された。他に特に記載されない限り、粗面LPSが、インビトロの研究に使用された。

【0159】

アデノウイルス遺伝子導入実験のために、ヒトRA滑膜繊維芽細胞をアデノウイルスベクターと感染効率100で培養して、2時間後に洗浄し、完全培地で24時間培養して、24時間刺激した。各工程後に、上清を回収した。

【0160】

記述がある場合、細胞は刺激前に37 °Cで30分間、10 μg/ml 抗CD14抗体、10 μg/ml IL1受容体アンタゴニスト、10 μg/ml 抗TLR2抗体、25 μg/ml 抗TLR4抗体、10 μg/ml 並びに25 μg/ml アイソタイプコントロール抗体、25 μg/ml ポリミキシンB、または1 μg/ml msbB LPSでプレインキュベートした。記述がある場合、組換えテネイシンCおよびFBG、LPSは、細胞に添加する前に15分間沸騰させた。

【0161】

MTT細胞生存率アッセイ(Sigma, Poole, UK)によって調べたところ、全ての場合において、細胞の生存率は、実験中を通して顕著に影響を受けていなかった。

【0162】

上清はその後、製造業者の使用説明書に従い酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によって、サイトカインTNF-α、IL-6、およびIL-8の存在を調べた。吸光度は、分光光度法ELISAプレートリーダー(Labsystems Multiscan Biochromic, Vantaa, Finland)で読み取り、Ascent software program(Thermo Labsystems, Altrincham, UK)を用いて解析した。

【0163】

結果

テネイシンCは、初代ヒトRA滑膜繊維芽細胞およびマクロファージにおいて、TNF-α、IL-6およびIL-8合成を誘導する

次に、テネイシンCが自然免疫応答を活性化するかどうかを調べた。テネイシンCを、初代ヒトマクロファージおよびRA滑膜繊維芽細胞を刺激するために使用し、炎症性サイトカインTNF-α、IL-6およびIL-8の産生を調べた。細菌の細胞壁成分、LPSを、ポジティブコントロールとして用いた。テネイシンCは、LPSとは顕著に異なり、細胞型特異的なサイトカイン特性を誘導した。テネイシンCは、ヒトマクロファージにおいてTNF-α、IL-6およびIL-8の産生を用量依存的に刺激した(図5a)。しかしながら、テネイシンCは滑膜繊維芽細胞においてIL-6合成のみを誘導し、一方LPSは、IL-6およびIL-8の両方を誘導した(図5b)。LPSおよびテネイシンCはどちらも、繊維芽細胞のTNF-α合成を誘導しなかった(データ非掲載)。テネイシンCによるヒトマクロファージにおけるIL-6の刺激(図5c)、IL-8およびTNF-αの刺激、滑膜繊維芽細胞におけるIL-6の刺激(非掲載)は、熱感受性であり、LPS阻害薬、ポリミキシンBによって影響されなかった。これらの結果は共に、テ

10

20

30

40

50

ネイシンCによるサイトカイン誘導が、LPSのコンタミネーションに起因しない事に対して、強力な証拠を提供する。

【0164】

フィブリノーゲン様グロブ(FBG)は、テネイシンCの細胞活性化を媒介する。

テネイシンCは、大きな六量体の分子であり、その各ドメインは異なる細胞表面受容体に結合する(Orend (2005)に報告されているように)。テネイシンCの作用機構を理解することは、どのドメインがサイトカイン産生を促進する上で重要であることを同定することを必要とするであろう。異なる分子のドメインを含む組換えタンパク質を合成した(図10)。各ドメインは、大腸菌(E.coli)で作成して精製し(図11)、適切なタンパク質をリムルスアメボサイトライセートアッセイに供することによって、 $< 10 \text{ pg/ml}$ LPSを含むことが分かった。テネイシンCの一つのドメインのみに活性があった。フィブリノーゲン様グロブ(FBG)は、全長テネイシンCと同程度、ヒトマクロファージのTNF- α 合成を刺激し(図6a)、ヒトマクロファージのIL-6およびIL-8合成を刺激し(非掲載)、RA滑膜繊維芽細胞のIL-6を刺激した(非掲載)。FBGは、全長テネイシンCと同様に、LPSが誘導するようにはRA滑膜繊維芽細胞のIL-8合成を誘導しなかった(データ非掲載)。FBGが誘導するサイトカイン合成はまた、熱感受性であり、ポリミキシンBによって影響されなかった(データ非掲載)。

10

【0165】

テネイシンCのFBGドメインは、ヒトRA滑膜でのサイトカイン産生、およびマウスの関節炎を誘導する。

20

FBGが、RA患者の滑膜での炎症性サイトカインの発現を促進できるかどうかを調べた。当該RA組織モデル(全ての滑膜細胞型の混合群を含む)は、自発的に高レベルのIL-6、IL-8およびTNF- α を産生する(Brennan (1989))(図6b)。FBGはさらに、これら全てのサイトカインの合成を増強させた(図6b)。FBGが、インビボでの炎症を誘導できるかどうかを測定するために、野生型マウスに対しFBGを関節内に注射した。一過性かつ用量依存的な関節炎の刺激が観察された。炎症もプロテオグリカンの損失も、注射されていないマウス、またはPBS(図6c-e)もしくは 100 ng のFBG(データ非掲載)によって注射されたマウスにおいては、生じなかった。 $1 \mu\text{g}$ のFBGで注射したマウスにおいて、炎症性細胞浸潤(図6f)、軽度の滑膜炎、パンヌス形成(図6g)およびプロテオグリカン損失(図6h)が観察された。 $3 \mu\text{g}$ のFBGで注射したマウスにおいて、同様の応答が見られた(データ非掲載)。組織学的定量によると、FBGで注射したマウスにおいて、高レベルの細胞浸潤物、滲出物および軟骨細胞死が、中程度の軟骨表面びらんおよび骨損傷とともに観察された(図6i)。

30

【0166】

FBG媒介サイトカイン合成は、MyD88に依存している

フィブリノーゲンを含む多くのDAMPが(Smiley (2001))、TLRの活性化により、自然免疫応答を刺激することが明らかになってきている。それゆえ、TLRもまたテネイシンC誘導サイトカイン産生を媒介するかどうかを調べた。ミエロイド系分化因子88(MyD88)は、TLR3を除く全てのTLRによるシグナル伝達に必要である(O'Neill (2008))。ドミナントネガティブなMyD88を発現するアデノウイルスによる滑膜繊維芽細胞の感染は、FBGのIL-6誘導を消失させたが、GFPコントロールウイルスは消失させなかった(図7a)。これらのデータは、FBG誘導性炎症が、機能性MyD88に依存していることを示唆している。IL-1受容体アンタゴニストの添加がサイトカインの誘導を阻害しなかったため、FBGの当該効果はIL-1によって媒介されるのではないようである(データ非掲載)。FBGの作用がMyD88依存的事であることを確認するために、MyD88遺伝子を標的として欠失させたマウスから単離された胚繊維芽細胞において、FBGがサイトカイン合成を刺激しないことを証明した。TLR2リガンドであるPAM3、TLR4リガンドであるLPS、およびIL-1はいずれも、MyD88を介してシグナルを伝達する。これらによる刺激はまた、欠損マウス由来MEFにおいては、消失していた。しかしながら、MyD88を介してシグナルを伝達しない、T

40

50

NF- κ B は、影響を受けなかった (図 7 b)。野生型 MyD88 の再遺伝子導入は、これらの細胞の FBG、PAM3、LPS および IL-1 への応答性を回復させた (データ非掲載)。

【0167】

FBG は TLR4 を介してシグナルを伝達する

TLR は、内在性のリガンドに対し、特異性を示す；タンパク質は TLR2 および TLR4 のうちの一方または両方によって、認識される (O'Neill (2008) に概説されている)。TLR4 の中和抗体は、FBG および LPS によって誘導されるヒトマクロファージでの IL-6、IL-8 および TNF- α の合成、並びに RA 滑膜繊維芽細胞での IL-6 の合成を阻害したが、TLR2 リガンドである PAM3 の機能には影響を与えなかった。アソタイプに適合するコントロールは、いずれのリガンドによって誘導されるサイトカイン合成にも影響を与えなかった (ヒトマクロファージによる TNF- α 合成を図 8 a に示す)。FBG の作用が TLR4 に依存していることを確認するために、TLR4 遺伝子を標的として欠失させたマウスから単離された胚繊維芽細胞またはマクロファージにおけるサイトカイン合成を、FBG が刺激しないことを証明した。FBG 媒介サイトカイン合成は、TLR2 遺伝子を標的として欠失させたマウスから単離された胚繊維芽細胞またはマクロファージにおいて、影響されなかった。TLR2 欠損マウスから単離された細胞は、PAM3 には非応答性であったが、LPS および IL-1 には応答性であった。TLR4 欠損マウスから単離された細胞は、LPS に非応答性であったが、PAM3 および IL-1 には応答した (図 8 b、c)。さらに、TLR4 の発現は、インビボでの FBG による関節炎誘発性作用に必要であった；FBG は TLR2 欠損マウスにおいて関節炎を誘導可能であったが、TLR4 欠損マウスにおいては不可能であった (図 12)。

10

20

【0168】

FBG および LPS に対する異なる共役受容体の必要性

TLR4 を介した LPS のシグナル伝達は、可溶性タンパク質 MD-2 と、GPI 結合細胞表面 CD14 または可溶性 CD14 とを含む、受容体複合体によって媒介される (Fitzgerald (2004) に概説されている)。次に、TLR4 の FBG 活性化に CD14 および MD-2 がどうかを調べた。本実験でのポジティブコントロールとして、MD-2 および CD14 の両方を必要とする、滑面グリコシル化 LPS の活性を調べた (Jiang (2005))。LPS が媒介する、ヒトマクロファージによる IL-6、IL-8 および TNF- α 合成、並びに RA 滑膜繊維芽細胞による IL-6 合成は、抗 CD14 抗体と、MD-2 に結合する LPS を求めて競いあう、msbB 変異大腸菌 (*E. coli*) 由来のアнтаゴニストの LPS (Coats (2007)) とによって、阻害された。反対に、TLR2 活性化のためにこれらの共役受容体を必要としない PAM3 を介するサイトカイン合成も、FBG を介するサイトカイン合成も、抗 CD14 抗体または msbB 変異 LPS によって、影響を受けなかった (図 8 d は、ヒトマクロファージによる TNF- α 合成を示す)。これらのデータは、CD14 も MD-2 も、FBG 媒介サイトカイン合成に必要ではないことを示唆している。それゆえ、LPS および FBG は共に TLR4 の活性化を介してシグナルを伝達するが、異なる共役受容体を必要としてもよい。

30

40

【0169】

実施例 5 - ヒト組織における、テネイシン C の作用および合成の阻害

本実施例では、ヒト RA 滑膜における、(1) テネイシン C の炎症促進性作用の阻止、および (2) テネイシン C の発現の阻害の影響を調べる。

【0170】

方法

ペプチド合成

FBG ドメイン全体を含む、9 個の重複ペプチド (表 2) は、Biogenes, Germany によって合成された。ペプチドは、室温で切断され (切断混合物：90% トリフルオロ酢酸、5% チオアニソール、3% エタンジチオール、2% アニソール)、逆相高速液体クロマトグラフィーで精製され、MALDI-TOF MS スペクトル分析で特徴を明らかにした。

50

ペプチドの純度は、高速液体クロマトグラフィーによって測定し、>85%であった。

【0171】

当該機関は、ペプチド7を合成できなかった。おそらく、ペプチド鎖の伸長を妨げる二次構造が形成されたからであろう((LaFleur (1997)に既報であるように)。

【表2】

ペプチド #	アミノ酸配列
1	TIGLLYPFPKDCSQAMLNQDTSGLYTIYL [配列番号20]
2	YTIYLNQDKAEALEVFCDMTSDGGGWIVFL [配列番号21]
3	WIVFLRRKNGRENFYQNWKAYAAGFGDRRE [配列番号22]
4	GDRREEFWLGLDNLNKITAGGQYELRVD [配列番号23]
5	ELRVDLRDHGETAFVYDKFSVGDATRYK [配列番号24]
6	KTRYKLVKVEGYSGTAGDSMAYHNGRSFST [配列番号25]
7	RSFSTFDKDTDSAITNCALSYKGAFWYRN [配列番号26]
8	WYRNCHRVNLMGRYGDNNHSQGVNWFHWKG [配列番号27]
9	FHWKGHEHSIQFAEMKLRPSNFRNLEGRRKRA [配列番号28]

表2. ヒトテネイシンCのFBGドメイン全体に及ぶ、重複ペプチド

【0172】

患者の検体および細胞培養液

RA膜細胞(全ての滑膜細胞型の混合群を表す)は、関節置換手術を受けた患者から取得した滑膜から単離された(Brennan(1989))。滑膜組織は、5%ウシ胚血清(FCS)(GIBCO)、5mg/mlコラゲナーゼIV(Sigma)および0.15mg/mlDNA分解酵素I(Sigma)を含むRPMI1640(GIBCO)中で分解し、37^oCで2時間培養した。

【0173】

培養後、滑膜組織は、ナイロンメッシュを通過させて、滅菌ピーカーヘビベッティングした。細胞はその後、完全培地(10%FCSを補ったRPMI1640)で三回洗浄した。RA滑膜繊維芽細胞は、10%FBS、1 μ Mグルタミン、100U/mlペニシリン、およびストレプトマイシンを補ったDMEM(Bio-Whittaker)中での選抜によって、RA膜細胞の混合群から単離された。ヒト単核球は、末梢血液(London Blood Bank)から単離され、マクロファージは、100ng/mlのM-CSFで4日間分化後の単核球に由来した。

【0174】

本研究は、地域の信頼のおける倫理委員会によって承認され、廃棄組織(関節置換手術後の滑膜)は、署名されたインフォームドコンセントを患者から受け取り、患者の身元を保護するために匿名化した後にのみ、入手した。

【0175】

細胞刺激およびサイトカイン合成の評価

単離した直後に、RA膜細胞は、96穴組織培養プレートにおいて、10% (v/v) FBSおよび100 U/mlペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI 1640中で、ウェルあたり 1×10^5 個の細胞で培養した。細胞は、添加なしのバッファークントロール (PBS、1% BSA、0.01% NaN_3) と、または25 μM 、100 μM もしくは250 μM の各FBGスパニングペプチドと、37°Cで24時間培養した。

【0176】

滑膜繊維芽細胞 (継代数2または3のいずれかのみ使用) は3.5-cmディッシュに 5×10^4 細胞の濃度で蒔いた。siRNAは、最終濃度10 nMで、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて無血清のOptiMEM I中で4時間、遺伝子導入された。ヒトテネイシンCに対する二つの異なるsiRNAが使用された (s7069およびs229491) (Applied Biosystems)。

10

【0177】

s7069のsiRNA配列は: (センス5' CGCGAGAACUUCUACCAAAAtt3' [配列番号29]、アンチセンス5' UUUUGGUAGAAAGUUUCUCGC Gtc3' [配列番号30]) であり、s229491のsiRNA配列は(5' GGAUAUGAAUAAGAAGAtt3' [配列番号31]、アンチセンス5' UCUUCUUUAUUCAUUUCCgg3' [配列番号32]) である。ルシフェラーゼ (Dharmacon) に対するsiRNAは、非標的コントロールとして遺伝子導入された。

【0178】

遺伝子導入の4時間後に、培地を、10% FBS (v/v) を含む予め平衡化したダルベッコ変法イーグル培地に交換し、細胞をさらに48時間および72時間、培養した。細胞はその後、10 ng/ml LPSで、37°Cで24時間刺激した。テネイシンCのmRNAおよびタンパク質のレベルは、それぞれPCRおよびウエスタンブロッティングによって、定量した。全RNAは、QiaAmp RNA Blood mini kit (Qiagen, Germany) を用いて、細胞から抽出した。cDNAは、SuperScript (登録商標) III Reverse Transcriptase (Invitrogen) および18-mer oligo dTs (Eurofins MWG Operon) を用いて、等量の全RNAから合成した。

20

【0179】

遺伝子発現は、TaqManプライマーセットヒトテネイシンC (Hs01115663-m1) およびCorbett Rotor-gene 6000 machine (Corbett Research Ltd) のヒトリボソームタンパク質の内在性コントロール (RPLPO) (4310879E) (Applied Biosystems) を使用した、定量的リアルタイムPCRに基づく、比較Ct法 (Ct法) によって分析した。テネイシンCタンパク質は、SDS PAGEおよび抗体MAB1908 (Millipore) を用いたウエスタンブロッティングによって、細胞上清および細胞可溶化物中に、検出された。

30

【0180】

マクロファージは、96穴組織培養プレートにおいて、5% (v/v) FBSおよび100 U/mlペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI 1640中で、刺激前の24時間、ウェル当たり 1×10^5 個の細胞で、培養した。細胞は、添加なし、1.0 μM FBG、1 ng/ml LPSまたは1 μM もしくは20 μM FBGペプチドで、37°Cで24時間培養した。記述がある場合、細胞は20 μM FBGペプチドと15分、プレインキュベートした。

40

【0181】

細胞の生存率は、MTT cell viability assay (Sigma, Poole, UK) によって調べたところ、実験中を通して、顕著に影響を受けなかった。上清について、製造業者 (R&D systems) の使用説明書に従い酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によって、サイトカインTNF- α 、IL-6、およびIL-8の存在を調べた。吸光度は、分光光度法ELISAプレートリーダー (Labsystems Multiscan Biochromic, Vantaa, Finland) で読み取り、Ascent software program (Thermo Labsystems, Altrincham, UK) を用いて解析した。

【0182】

50

統計手法

平均値 (Mean)、SDおよびSEMは、GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) を用いて計算した。

【0183】

結果

特異的FBGペプチドによる、RA膜培養物中のサイトカイン合成の遮断

ペプチド阻害の手法は、テネイシンCのFBGドメイン中のV3インテグリン結合部位を特定して、テネイシンCのFBGドメインに反応する細胞接着を回避するために使用することに、成功している (Lafleur (1997) and Yokoyama (2000))。

【0184】

FBGの全配列に及ぶ、30以下のアミノ酸からなる、一連の8つの重複ペプチドを合成した (表2)。ペプチドに対し、RA滑膜培養物において自発的サイトカイン合成を遮断する能力を試験した。TNFおよびIL8合成は、ペプチド3および8によって阻害されたが、他のいずれのペプチドによっても阻害されなかった (図15で示したTNF)。ペプチド3および8は、最高濃度において、それぞれ95%および56%に達する阻害で、サイトカイン合成を用量依存的に阻害した (図16)。ペプチド5は、TNF合成には影響を与えなかったが、RA膜細胞のIL8合成は、最大81%の阻害で、用量依存的に遮断した (図16)。

【0185】

サイトカイン産生誘導の原因となるFBG内の活性ドメインを位置決定するために、各FBGペプチドで、初代マクロファージを刺激した。ペプチド1、5、および6は全て、用量依存的に、サイトカイン合成を誘導した (図17)。

【0186】

ヒトマクロファージにおいて、いずれのペプチドがFBG誘導サイトカイン合成を遮断し得るかを測定するために、FBG全体またはLPSのどちらかで刺激する前に、各FBGペプチドで細胞をプレインキュベートした。ペプチド5は特異的にFBG媒介サイトカイン合成を遮断し、ペプチド8はLPSおよびFBGの両方に反応するサイトカイン合成を遮断した (図18)。

【0187】

従って、ペプチド8は、任意の刺激によって誘導されたサイトカイン産生を、非特異的に遮断する。当該ドメインは、細胞接着を媒介するFBGのインテグリン結合ドメインであり、従って、組織培養プレートへの細胞付着を防ぐよう、作用している可能性がある。ペプチド5はFBG誘導サイトカイン合成を特異的に遮断し、このことは、当該ドメインを標的とすることがテネイシンC誘導性炎症を防ぐ上で有用である可能性を示唆している。

【0188】

テネイシンC遺伝子発現のサイレンシングが、RA滑膜繊維芽細胞におけるサイトカイン合成を阻害する

ヒトRA滑膜におけるテネイシンCの発現を阻害する効果を調べることにより、滑膜繊維芽細胞を、RAにおけるテネイシンCの主要な供給源として同定した (図1C?) (in Goh 2010)。

【0189】

siRNAが媒介する、これらの細胞におけるテネイシンCの発現のノックダウンは、最大効率94 - 96%の間で出現した (図19)。テネイシンCのsiRNAを遺伝子導入した細胞において、サイトカイン合成およびLPS誘導サイトカイン産生の両方の基礎レベルは、コントロール細胞と比較して、それぞれ38%および44%阻害された (図19)。

【0190】

これらのデータによって、RA滑膜繊維芽細胞におけるテネイシンCのサイレンシングが、炎症性サイトカインの合成を減少させることが明らかになり、また、テネイシンCの

10

20

30

40

50

発現の消失が、滑膜における炎症を抑制する実践可能な戦略であることが示唆される。

【0191】

本研究によって、(ペプチドによる)テネイシンC活性の遮断および(s i R N Aによる)テネイシンCの発現の遮断が、ヒトRA滑膜における炎症性サイトカインを減少させることが確認された。これらのデータは、RAおよび他の炎症性疾患を治療する上で、テネイシンCの遮断が、潜在的かつ臨床的に有効であることを示している。

【0192】

実施例6 - インビトロでのシトルリン化

等量の、タンパク質と2xシトルリン化バッファー(200mM Tris HCl、pH 7.4、20mM CaCl₂、10mM DTT)とを混合させた。基質タンパク質1mg当たり8.75Uのウサギ骨格PAD(製品番号P1584、Sigma)を添加し、37で3時間、または50で2時間培養した。シトルリン化は、SDS PAGEのクマシーブルー染色によって可視化されたサイズシフト、またはAMC検出によって確認した。

10

【0193】

図20に示された結果は、精製したフィブリノーゲンおよびFBGが、インビトロでシトルリン化され得ることを証明している。

【0194】

精製した全長テネイシンCのインビトロでのシトルリン化は、図21の結果によって示されている。

20

【0195】

実施例7 - シトルリン化タンパク質のAMC(抗修飾シトルリン)検出

シトルリン化は、抗シトルリン(Modified)Detection Kit(Millipore(カタログ: 17-347))のプロトコルを用いて検出した。

A. ニトロセルロースプロットの調製

1. SDS-PAGEを行い、ニトロセルロースに転写する。プロットを、水で5分x2回洗浄する。

2. プロットを、室温で15分間、TBS中の0.1%オボアルブミン10mlで培養する。

30

3. 水で10分x2回洗浄する。

B. シトルリン残基の修飾

1. 3mlの試薬Aと3mlの試薬Bとを混合する。用時調製する。

2. 光を通さない容器で、プロットに修飾バッファーを添加し、37で5-7時間培養する。

3. 水で4-5回プロットをリンスする。

C. 修飾シトルリン残基の検出

1. TMS中で新たに調製された3%脱脂粉乳において、30分-1時間、プロットをブロックする。

2. プロットを、TBS-MLKで1:1000に希釈した抗修飾シトルリン抗体5-8mlで、4で振とうしながら一晩中培養する(室温で2-3時間培養するのと同様の働きと思われる)

40

3. プロットを水で3回洗浄し、その後15分x1回、その後5分x3回洗浄する。

4. プロットを、TBS-MLKで1:5000に希釈したヤギ抗ウサギHRP結合IgG5-8mlで、室温で振とうしながら1時間培養する。

5. ステップ3と同様に、プロットを洗浄する。

6. TBS-0.05% Tween 20で3-5分、プロットを洗浄する。

7. プロットを、水を4-5回交換して、リンスする。

8. 検出にECLプラスを使用する。

【0196】

図22は、ウエスタンプロットによる、FBGおよびテネイシンCのシトルリン化の確

50

認を示している。

【0197】

実施例8 - FBGは、インビトロで、PADによってシトルリン化される。

図23は、FBGが、インビトロで、PADによってシトルリン化されていることを示す。特に、クマシーブルー染色SDS PAGEおよび抗修飾シトルリン特異的抗体によるウエスタンブロッティングにおける、FBGの分子量の増加は、FBGが用量依存的および時間依存的にrPAD2、hPAD2およびhPAD4によってシトルリン化されることを証明している。

【0198】

実施例9 - シトルリン化がテネイシンCの炎症促進性活性を調節することの証明

初代ヒトマクロファージは、上述のように単離され、96穴組織培養プレートにおいて、刺激前に24時間、5% (v/v) FBSおよび100 U/mlペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI 1640中で、ウェル当たり 1×10^5 個の細胞で、培養した。細胞は、添加なし (UN)、異なる濃度 (μM) の天然のFBG (nFBG) もしくはcitFBG (cFBG)、シトルリン化バッファー単独 (CIT)、またはPAD酵素を添加したcitバッファー (CIT + PAD) で、37^oC 24時間培養した。

【0199】

細胞の生存率は、MTT cell viability assay (Sigma, Poole, UK) によって調べたところ、実験中を通して、顕著な影響を受けていなかった。上清に対して、製造業者 (R&D systems) の使用説明書に従い酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によって、サイトカインTNF- α の存在を調べた。吸光度は、分光光度法ELISAプレートリーダー (Labsystems Multiscan Biochromic, Vantaa, Finland) で読み取り、Ascent software program (Thermo LabSystems, Altrincham, UK) を用いて解析した。

【0200】

図24は、シトルリン化が、FBGによって刺激されるサイトカイン産生を増強することを示している。

【0201】

実施例10 - 健常コントロールとは異なり、RA患者の血清は、シトルリン化テネイシンCおよびシトルリン化FBGに応答する

シトルリン化タンパク質のSDS - PAGE

33.33 μl のシトルリン化反応液 (cit - TNC単独または、cit - FBGと組み合わせたcit - TNC) を、1.0 mmの二次元単一レーンウェルを使用したNuPAGE (登録商標) Novex 4 - 12% Bis - trisゲルに流した。

【0202】

RA血清による、ウエスタンブロット検出

電気泳動後、タンパク質はニトロセルロースに転写され、ニトロセルロース膜はブロックし、その後ストライプにカットした (最大8本のストライプ、 $\sim 0.7\text{ cm}$ 幅)。ストライプは、5% ミルクTBS - tweenに1:100で希釈した、RA患者の血清または健常個体の血清で、培養した。ストライプを15 mlのファルコンチューブに入れて、室温で1時間、回転培養装置で培養し、その後TBS - Tweenのチューブ内で5分 \times 3回、15分 \times 1回、洗浄した。ストライプは、その後、1:5000で希釈したマウス抗ヒトIgG二次抗体で、室温で1時間培養し、TBS - Tweenのディッシュ内で5分 \times 3回、15分 \times 1回洗浄した。ストライプは最後にECL試薬と培養し、フィルムに曝した。

【0203】

図25Aは、天然 (nTNC) およびシトルリン化 (cTNC) 精製ヒト組換えテネイシンCのクマシー染色ゲル (上図) と、AMC (抗修飾シトルリン) kitを用いたウエスタンブロットにより証明したテネイシンCのシトルリン化 (下図) を示している。

【0204】

図25Bは、RA患者 (RA) または健常コントロール (NH) (n = 50) 由来の血

10

20

30

40

50

清で標識した c T N C の代表的なウエスタンプロットを表している。n T N C のプロットにおいて、いずれの血清に対しても、反応性は観察されなかった（非掲載）。

【0205】

図26および27は、R A 患者のサブセット由来の血清が、c i t T N C に反応性を示すことを、表している（レーン4のR A 患者のサンプルを参照）。

【0206】

図28は、健常対象由来の血清が、c i t T N C に対して反応性を示さないことを表している。

【0207】

図29は、シトルリン化テネイシンCおよびシトルリン化F B G に対するR A 血清を示している。c F B G を加えたc T N C のウエスタンプロットを、同じウェルで行い、7人の異なるR A 患者由来の血清で標識した。全長テネイシンC（320kD）に反応するがF B G には反応しない患者サブセット（レーン4、5）、またはシトルリン化F B G（27kd）に反応するが全長テネイシンCには反応しない患者（レーン6）が観察された。

10

【0208】

全長シトルリン化テネイシンCおよびシトルリン化F B G を同じレーンで流したゲルは、複数の患者が全長テネイシンCに反応することを示す。テネイシンCに反応する患者の中で、一つのサブセットのみ、F B G にもまた反応し、従って、それらは当然のことながら異なるドメインを認識しているに違いない。

【0209】

実施例11 - L C - M S / M S による、シトルリン化部位の明確化

図30および表3を参照すると、シトルリン化アルギニン残基は、L C - M S / M S によって同定された。17個のアルギニンのうち、5個はシトルリン化されず、3個のアルギニンは当該L C - M S / M S 分析では網羅されず、シトルリン化に使用される酵素とは無関係に9個のアルギニン残基がシトルリン残基へと修飾されている。

20

【表 3 - 1】

アルギニンの位置	配列	m/z	荷電 (Charge)
55	NGR (+. 98) ENFYQNWK [配列番号33]	728.8331	2+
72	AYAAGFGDR (+. 98) R [配列番号34]	542.7619	2+
120	TR (+. 98) YKLG [配列番号35]	405.2478	2+
169	GAFWYR (+. 98) RNC (+57.02) HR [配列番号36]	684.3063	2+
173	NC (+57.02) HR (+. 98) VNL LM (+15.99) GR [配列番号37]	637.2995	2+
173	NC (+57.02) HR (+. 98) VNL LMGR [配列番号38]	629.3023	2+
173	NC (+57.02) HR (+. 98) VNL LM (+15.99) GR [配列番号39]	425.2011	3+
173	N (+27.99) C (+57.02) HR (+. 98) VNL LMGR [配列番号40]	643.2988	2+
209	L (+57.02) R (+. 98) PSNFR R [配列番号41]	474.2563	2+
214	L (+27.99) RPSNFR (+. 98)) NLEGR [配列番号42]	744.3896	2+
214	LRPSNFR (+. 98) NLEGR [配列番号43]	730.3915	2+

10

20

【表 3 - 2】

214	LRPSN (+. 98) FR (+. 98) N LEGR [配列番号44]	487.5948	3+
214	L (+27. 99) RPSNFR (+. 98) NLEGR [配列番号45]	496.5952	3+
214	LRPSNFR (+. 98) NLEGR [配 列番号46]	404.7247	4+
214	LRPSNFR (+. 98) NLEGR [配 列番号47]	487.2641	3+
219	N (+27. 99) LEGR (+. 98) R K [配列番号48]	451.2462	2+
219	L (+27. 99) RPSNFRNLEGR (+. 98) R [配列番号49]	548.6292	3+
214/219	LRPSN (+. 98) FR (+. 98) N LEGR (+. 98) R [配列番号50]	539.9565	3+
214/219	LRPSNFR (+. 98) NLEGR (+ . 98) [配列番号51]	730.8856	2+
214/219	LRPSNFR (+. 98) NLEGR (+ . 98) R [配列番号52]	808.9345	2+
214/219	LRPSNFR (+. 98) NLEGR (+ . 98) R [配列番号53]	539.6262	3+

表 3

【0210】

実施例 12 - シトルリン化抗体エピトープの同定

図 31 を参照して、シトルリン残基を包含する 6 個のシトルリン化 FBG ペプチドに対
する、20 個の RA 血清および 20 個のコントロール血清における抗体応答を評価した。

【0211】

ここで評価されたペプチドは次の通りである：

R55 : CVFLRRKNG - R - ENFYQNW C [配列番号 54]

CIT55 : CVFLRRKNG - C i t - ENFYQNW C [配列番号 55]

R72 : CAYAAGFGD - R - REEFWLG L C [配列番号 56]

CIT72 : CAYAAGFGD - C i t - REEFWLG L C [配列番号 57]

R120 : CFSVGDAKT - R - YK L K V E G Y C [配列番号 58]

CIT120 : CFSVGDAKT - C i t - YK L K V E G Y C [配列番号 59]

R169 / 173 : CKGAFWY - R - NCH - R - VNLMGRC [配列番号 60]

CIT169 / 173 : CKGAFWY - C i t - NCH - C i t - VNLMGRC [配
列番号 61]

R209 / 214 / 219 / 220 : CEMKL - R - PSNF - R - NLEGR - R - R
- KRC [配列番号 62]

CIT209 / 214 : CEMKL - C i t - PSNF - C i t - NLEGR R KRC [配
列番号 63]

CIT219 / 220 : CEMKL RPSNFRNLEGR - C i t - C i t - KRC [配
列番号 64]

【0212】

シトルリン含有ペプチド CIT55、CIT209 / 214 および CIT219 / 220
に対する強力な抗体応答が、RA 血清において検出されたが、コントロール血清におい
ては検出されず、アルギニンを含むコントロールペプチドに対しては、応答は観察されな

10

20

30

40

50

かった。当該小コホートからのデータは、健常コントロールがいずれも陽性（健常群の第95百分位数を使用して決定）を示さなかったが、約35%のRA患者がCIT55エピトープに対して陽性であり、20%のRA患者がCIT209/214に対して陽性であり、30%の患者がCIT219/220に対して陽性であるだろうことを示す。同じ計算を、健常コントロール群と比較してRAを診断するために用いることができ、これらの群において同様の割合が期待される。

【0213】

本データは、患者を、citFBG抗体陽性またはcitFBG陽性に基づいて、階層化することを可能にするであろう。これらの陽性を示した患者は、シトルリン化FBGの活性を標的として設計された任意の薬剤による治療の候補となるであろう。複数のエピトープの存在はまた、citFBGを標的とする方法について情報を提供する - 例えば、仮にCIT55が存在すれば、治療はFBGの免疫原性の活性を遮断することを含んでもよく、仮にインテグリン結合部位がシトルリン化されれば、治療は当該ドメインの作用を遮断することを含んでもよい。

10

【0214】

実施例13 - FBGのシトルリン化は、HDFおよびRAFの細胞接着を減少させる

図32を参照すると、FBGはヒト皮膚繊維芽細胞（HDF）およびRA関節由来の滑膜繊維芽細胞（RAF）への接着促進性がある。FBGのシトルリン化は、HDFおよびRAFへの接着を減少させる。インテグリン v₃に結合することが知られている配列内の2つのアルギニンがシトルリン化されるため、接着の減少は、cFBGのインテグリン v₃への結合の減少によるものである。Yokoyama et al.は、FBG内の当該ペプチド配列が、細胞表面のavb₃インテグリンへの結合を介して、細胞接着を媒介することを特定した。ここに示されるように、1)シトルリン化は、インテグリン結合部位においてインビトロで生じ、2)これによって細胞接着は減少し、3)これはRASfにおいて起こる。このことは、RA関節において、当該部位におけるFBGのシトルリン化がRASfの接着を減少させ得ることを意味する。RASfの接着の減少は、疾病の進行のために多くの意味を有し得る。例えば、細胞遊走を促進可能であり（例えば、健全な関節組織への浸潤やその分解）、かつ、RASfの増殖（上述のように、持続的な滑膜肥厚）を促進可能である。

20

【0215】

参考文献

1. Smolen, J.S. & Maini, R.N. Interleukin-6: a new therapeutic target. *Arthritis Res Ther* 8 Suppl 2, S5 (2006).
2. Williams, R.O., Paleolog, E. & Feldmann, M. Cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Curr Opin Pharmacol* 7, 412-417 (2007).
3. Brentano, F., Kyburz, D., Schorr, O., Gay, R. & Gay, S. The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol* 233, 90-96 (2005).
4. O'Neill, L.A. Primer: Toll-like receptor signaling pathways-what do rheumatologists need to know? *Nat Clin Pract Rheumatol* (2008).
5. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305 (2002).
6. Bianchi, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5 (2007).
7. Gordon, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927-930 (2002).
8. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300 (2002).
9. Radstake, T.R., et al. Expression of toll-like receptors 2 and 4 i

30

40

50

- n rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis Rheum* 50, 3856-3865 (2004).
10. Roelofs, M.F., et al. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 52, 2313-2322 (2005).
 11. Sacre, S.M., et al. The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 170, 518-525 (2007). 10
 12. Choe, J.Y., Crain, B., Wu, S.R. & Corr, M. Interleukin 1 receptor dependence of serum transferred arthritis can be circumvented by toll-like receptor 4 signaling. *J Exp Med* 197, 537-542 (2003).
 13. Lee, E.K., Kang, S.M., Paik, D.J., Kim, J.M. & Youn, J. Essential roles of Toll-like receptor-4 signaling in arthritis induced by type II collagen antibody and LPS. *Int Immunol* 17, 325-333 (2005).
 14. Abdollahi-Roodsaz, S., et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis Rheum* 56, 2957-2967 (2007).
 15. Vanags, D., et al. Therapeutic efficacy and safety of chaperonin 10 in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind randomised trial. *Lancet* 368, 855-863 (2006). 20
 16. Chiquet-Ehrismann, R. & Chiquet, M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200, 488-499 (2003).
 17. Cutolo, M., Picasso, M., Ponassi, M., Sun, M.Z. & Balza, E. Tenascin and fibronectin distribution in human normal and pathological synovium. *J Rheumatol* 19, 1439-1447 (1992).
 18. McCachren, S.S. & Lightner, V.A. Expression of human tenascin in synovitis and its regulation by interleukin-1. *Arthritis Rheum* 35, 1185-1196 (1992). 30
 19. Salter, D.M. Tenascin is increased in cartilage and synovium from arthritic knees. *Br J Rheumatol* 32, 780-786 (1993).
 20. Chevalier, X., Groult, N., Larget-Piet, B., Zardi, L. & Hornebeck, W. Tenascin distribution in articular cartilage from normal subjects and from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37, 1013-1022 (1994).
 21. Hasegawa, M., et al. Expression of large tenascin-C splice variants in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Orthop Res* 25, 563-568 (2007).
 22. Orend, G. Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1066-1083 (2005). 40
 23. Brackertz, D., Mitchell, G.F. & Mackay, I.R. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 20, 841-850 (1977).
 24. Brennan, F.M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. & Feldmann, M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2, 244-247 (1989).
 25. Smiley, S.T., King, J.A. & Hancock, W.W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167, 2887-2894 (2001). 40

26. Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C. & Golenbock, D.T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect* 6, 1361-1367 (2004).
27. Jiang, Z., et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* 6, 565-570 (2005).
28. Coats, S.R., Do, C.T., Karimi-Naser, L.M., Braham, P.H. & Darveau, R.P. Antagonistic lipopolysaccharides block E. coli lipopolysaccharide function at human TLR4 via interaction with the human MD-2 lipopolysaccharide binding site. *Cell Microbiol* 9, 1191-1202 (2007).
29. Siri, A., et al. Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by two monoclonal antibodies. *Nucleic Acids Res* 19, 525-531 (1991).
30. Gondokaryono, S.P., et al. The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol* 82, 657-665 (2007).
31. Taylor, K.R., et al. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J Biol Chem* 282, 18265-18275 (2007).
32. Kim, H.M., et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130, 906-917 (2007).
33. Schaefer, L., et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 115, 2223-2233 (2005).
34. Foell, D., Witte, H. & Roth, J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 382-390 (2007).
35. Taniguchi, N., et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 48, 971-981 (2003).
36. Pullerits, R., et al. High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 1693-1700 (2003).
37. Kokkola, R., et al. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum* 48, 2052-2058 (2003).
38. Gutowski, N.J., Newcombe, J. & Cuzner, M.L. Tenascin-R and C in multiple sclerosis lesions: relevance to extracellular matrix remodelling. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 207-214 (1999).
39. Amin, K., et al. Inflammation and structural changes in the airways of patients with primary Sjogren's syndrome. *Respir Med* 95, 904-910 (2001).
40. Loots, M.A., et al. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 111, 850-857 (1998).
41. Lange, K., et al. Endothelin receptor type B counteracts tenascin-C-induced endothelin receptor type A-dependent focal adhesion and actin stress fiber disorganization. *Cancer Res* 67, 6163-6173 (2007).
42. Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Sakakura, T. & Aizawa, S. Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 6, 1821-1831 (1992).
43. Hoshino, K., et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752 (1999).

44. Takeuchi, O., et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451 (1999).
45. Keystone, E.C., Schorlemmer, H.U., Pope, C. & Allison, A.C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum* 20, 1396-1401 (1977).
46. van Lent, P.L., et al. Fcγ receptors directly mediate cartilage, but not bone, destruction in murine antigen-induced arthritis: uncoupling of cartilage damage from bone erosion and joint inflammation. *Arthritis Rheum* 54, 3868-3877 (2006). 10
47. Foxwell, B., et al. Efficient adenoviral infection with IkappaB alpha reveals that macrophage tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis is NF-kappaB dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8211-8215 (1998).
48. Kurt-Jones, E.A., et al. Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity. *J Endotoxin Res* 10, 419-424 (2004).
49. Todaro, G.J. & Green, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313 (1963). 20
50. Butler, D.M., Malfait, A.M., Maini, R.N., Brennan, F.M. & Feldmann, M. Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 29, 2205-2212 (1999).
51. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L.R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59 (1989).
52. Clark, R.A., Erickson, H.P. & Springer, T.A. Tenascin supports lymphocyte rolling. *J Cell Biol* 137, 755-765 (1997).
53. El-Karef, A., et al. Deficiency of tenascin-C attenuates liver fibrosis in immune-mediated chronic hepatitis in mice. *J Pathol* 211, 86-94 (2007). 30
54. Loike, J.D., Cao, L., Budhu, S., Hoffman, S. & Silverstein, S.C. Blockade of alpha 5 beta 1 integrins reverses the inhibitory effect of tenascin on chemotaxis of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes through three-dimensional gels of extracellular matrix proteins. *J Immunol* 166, 7534-7542 (2001).
55. Talts, J.F., Wirl, G., Dictor, M., Muller, W.J. & Fassler, R. Tenascin-C modulates tumor stroma and monocyte/macrophage recruitment but not tumor growth or metastasis in a mouse strain with spontaneous mammary cancer. *J Cell Sci* 112 (Pt 12), 1855-1864 (1999). 40
56. Jones (2000) *Matrix Biol.*, 19, 581-96
57. Harandl (2009) *Expert Review of Vaccines*, 8, 293-298
58. McIntyre (2006) *BMC Biotechnol.* 6: 1
59. Paddison (2002) *Genes Dev.* 16 (8): 948-58
60. Andreakos (2004) *Blood*, 103, 2229-37
61. Goh, F.G., Piccinini, A.M., Krausgruber, T., Udalova, I.A. & Midwood, K.S. Transcriptional regulation of the endogenous danger signal tenascin-C: a novel autocrine loop in inflammation. *J Immunol* 184, 2655-2662 (2010).
62. Midwood, K. et al. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint 50

t disease. *Nat Med* 15, 774-780 (2009).

63. LaFleur, D.W. et al. Aortic smooth muscle cells interact with tenascin-C through its fibrinogen-like domain. *J Biol Chem* 272, 32798-32803 (1997).
64. Taylor, P.C. & Feldmann, M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 5, 578-582 (2009).
65. Yokoyama, K., Erickson, H.P., Ikeda, Y. & Takada, Y. Identification of amino acid sequences in fibrinogen gamma -chain and tenascin C C-terminal domains critical for binding to integrin alpha vbeta 3. *J Biol Chem* 275, 16891-16898 (2000).
66. Sacre SM, Lo A, Gregory B, Simmonds RE, Williams L, Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM. *J Immunol*. 2008 Dec 1;181(11):8002-9. 10
67. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmstrom V, Feldmann M, Venables PJ: Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010, 233:34-54.
68. Fisher BA, Plant D, Brode M, van Vollenhoven RF, Mathsson L, Symmons D, Lundberg K, Ronnelid J, Venables PJ: Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 and clinical and radiological outcomes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011, 70:1095-1098.
69. Kinloch A, Tatzer V, Wait R, Peston D, Lundberg K, Donatien P, Moyses D, Taylor PC, Venables PJ: Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005, 7:R1421-1429. 20
70. Kinloch AJ, Alzabin S, Brintnell W, Wilson E, Barra L, Wegner N, Bell DA, Cairns E, Venables PJ: Immunization with *Porphyromonas gingivalis* enolase induces autoimmunity to mammalian alpha-enolase and arthritis in DR4-IE-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2011, 63:3818-3823.
71. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, Venables PJ: Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum* 2008, 58:3009-3019. 30
72. Snir O, Widhe M, Hermansson M, von Spee C, Lindberg J, Hensen S, Lundberg K, Engstrom A, Venables PJ, Toes RE, Holmdahl R, Klareskog L, Malmstrom V: Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2010, 62:44-52.
73. Snir O, Widhe M, von Spee C, Lindberg J, Padyukov L, Lundberg K, Engstrom A, Venables PJ, Lundberg J, Holmdahl R, Klareskog L, Malmstrom V: Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles. *Ann Rheum Dis* 2009, 68:736-743.
74. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ: Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010, 62:2662-2672. 40
75. Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, Holers VM: Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 2006, 116:961-973.
76. Uysal H, Bockermann R, Nandakumar KS, Sehnert B, Bajtner E, Engstrom A, Serre G, Burkhardt H, Thunnissen MM, Holmdahl R: Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *J Exp Med* 2009, 206:449-462. 50

77. Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, Serre G: Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcγ receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2008, 58: 678-688. Page 10 of 10

78. Sokolove J, Zhao X, Chandra PE, Robinson WH: Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcγ receptor. *Arthritis Rheum* 2011, 63:53-62.

79. Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebault A, Chan E, Drexler S, Sofat N, Kashiwagi M, Orend G, Brennan F, Foxwell B: Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med* 2009, 15:774-780.

80. Ruhmann M, Piccinini AM, Kong PL, Midwood KS: Endogenous activation of adaptive immunity: tenascin-C drives interleukin-17 synthesis in murine arthritic joint disease. *Arthritis Rheum* 2012, 64:2179-2190.

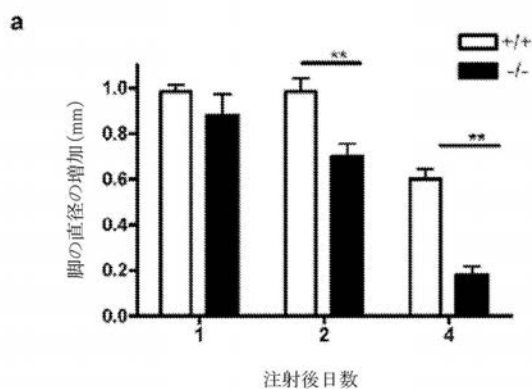
81. Goh FG, Piccinini AM, Krausgruber T, Udalova IA, Midwood KS: Transcriptional regulation of the endogenous danger signal tenascin-C: a novel autocrine loop in inflammation. *J Immunol* 2010, 184:2655-2662.

82. Page TH, Charles PJ, Piccinini AM, Nicolaidou V, Taylor PC, Midwood KS: Raised circulating tenascin-C in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012, 14:R260.

10

20

【 図 1 - 1 】



【 図 1 - 2 】

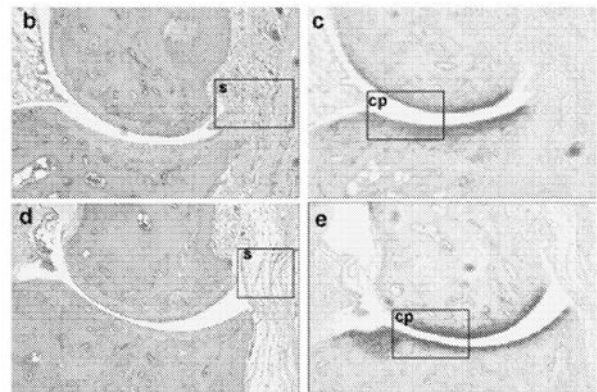
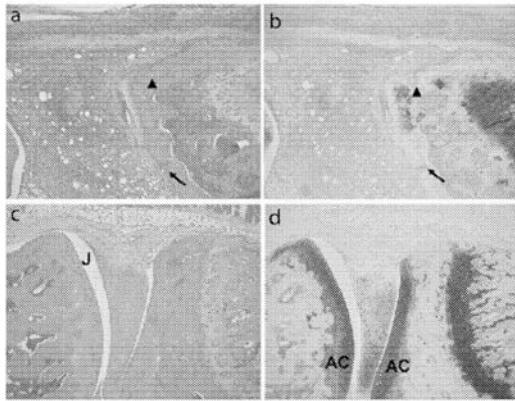
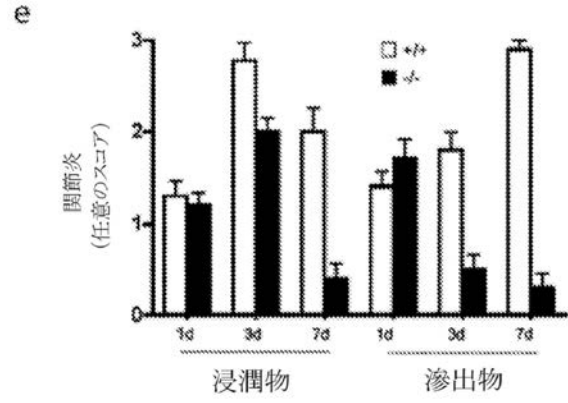


Figure 1

【 図 4 - 1 】



【 図 4 - 2 】



【 図 4 - 3 】

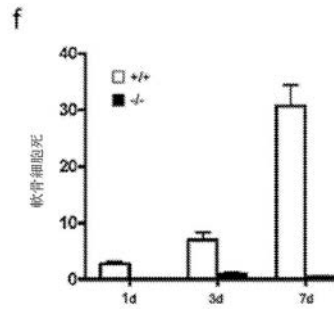


Figure 4

【 図 4 - 4 】

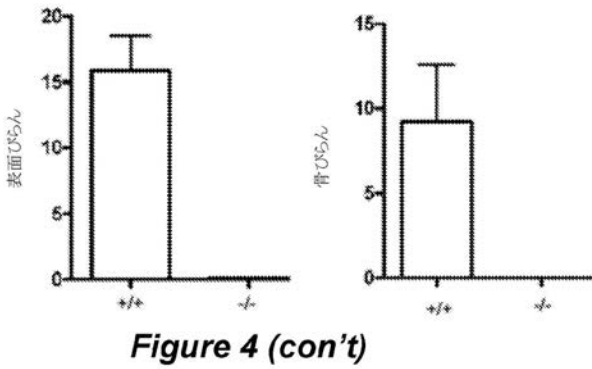
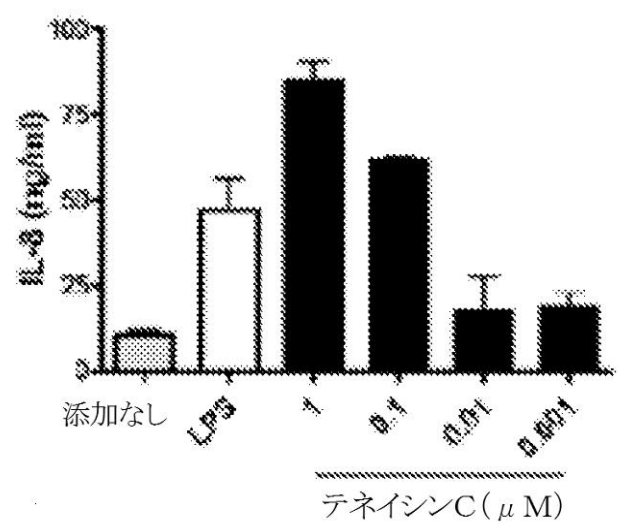


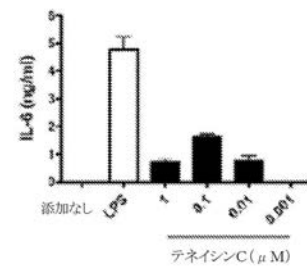
Figure 4 (con't)

【 図 5 - 2 】

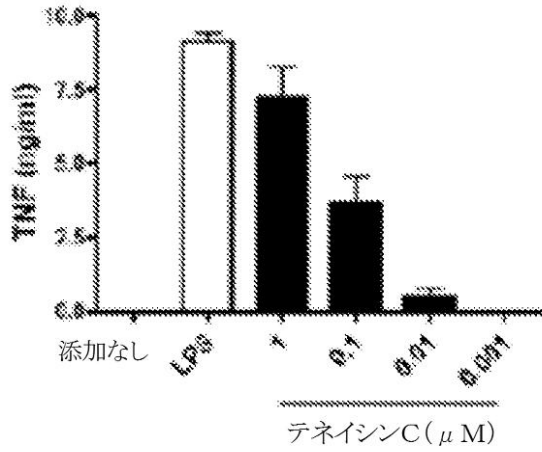


【 図 5 - 1 】

a 7/44



【 図 5 - 3 】



【 図 5 - 5 】

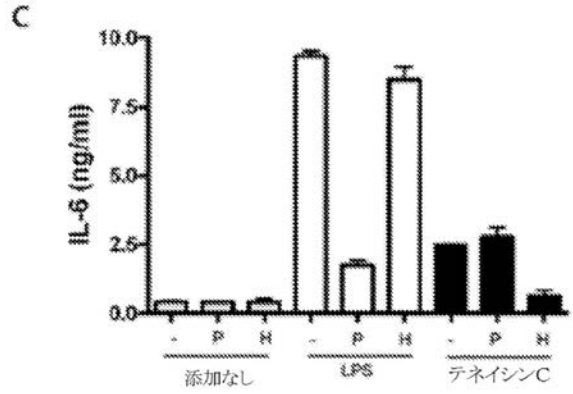
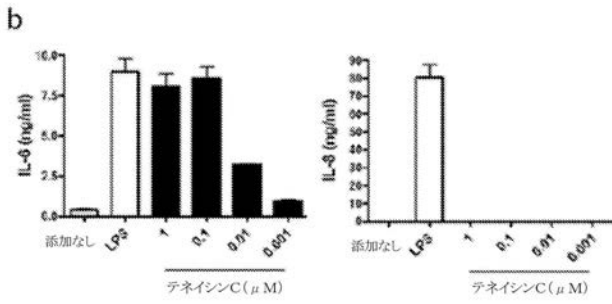
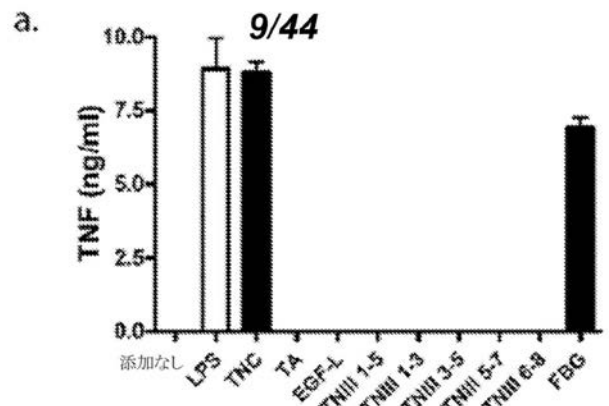


Figure 5

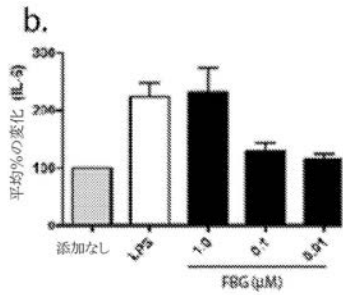
【 図 5 - 4 】



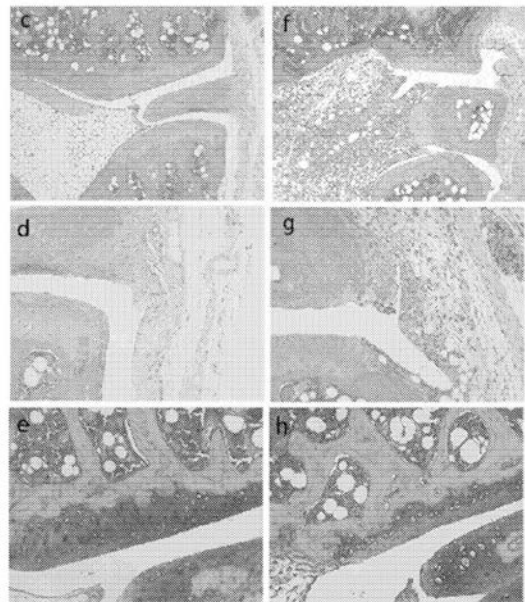
【 図 6 - 1 】



【 図 6 - 2 】



【 図 6 - 4 】



【 図 6 - 3 】

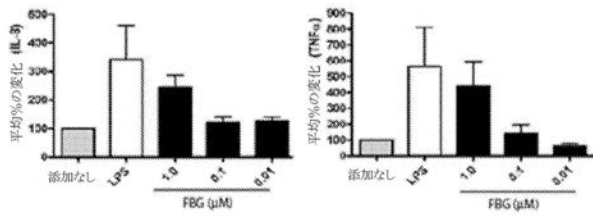


Figure 6

Figure 6 (con't)

【 図 6 - 5 】

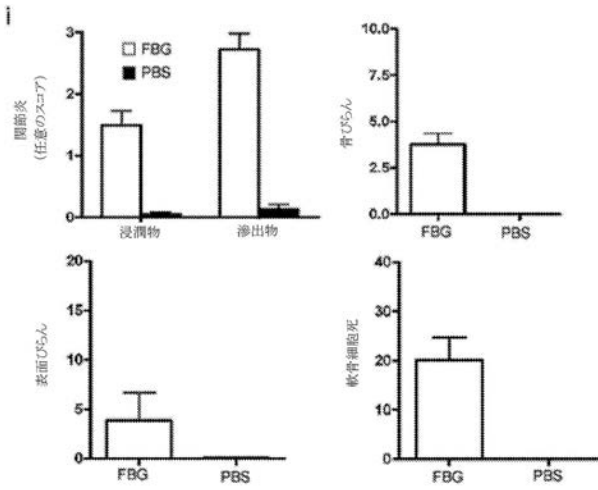
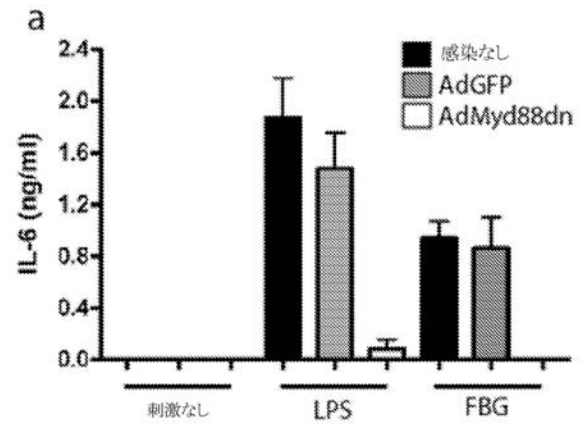


Figure 6 (con't)

【 図 7 - 1 】



【 図 7 - 2 】

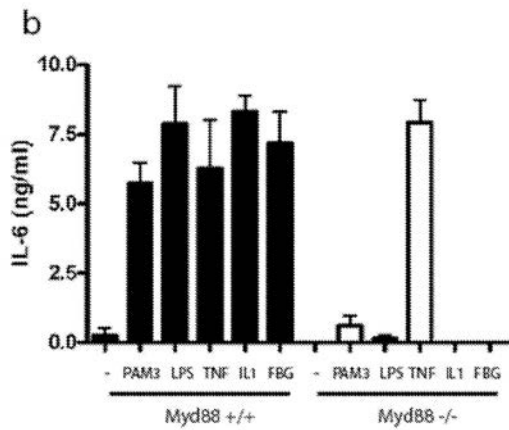


Figure 7

【 図 8 - 1 】

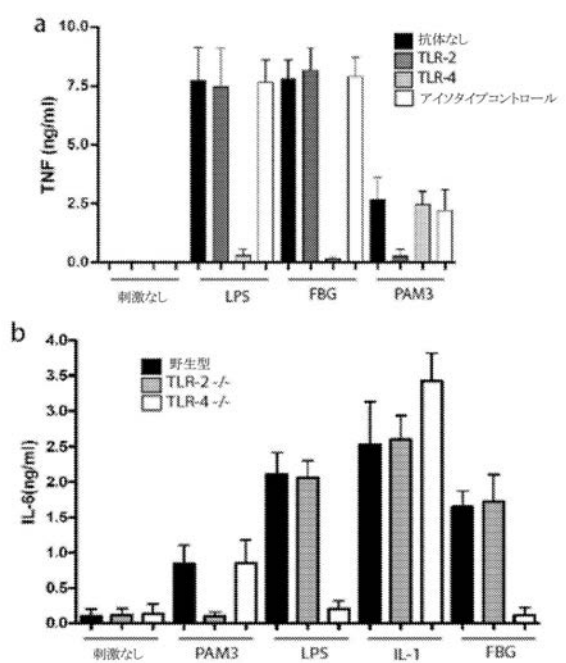


Figure 8

【 図 8 - 2 】

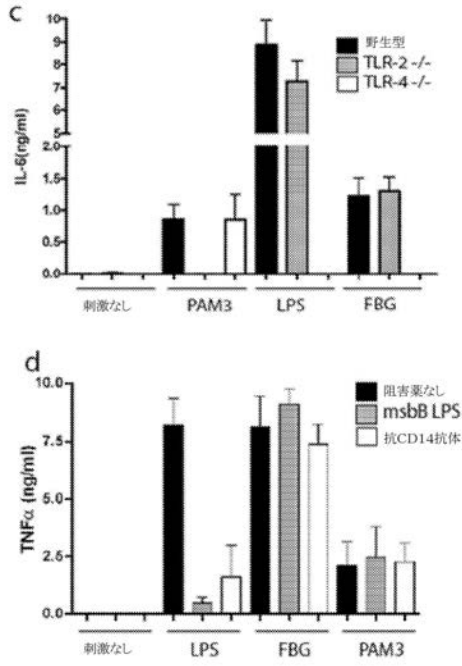


Figure 8 (con't)

【 図 9 】

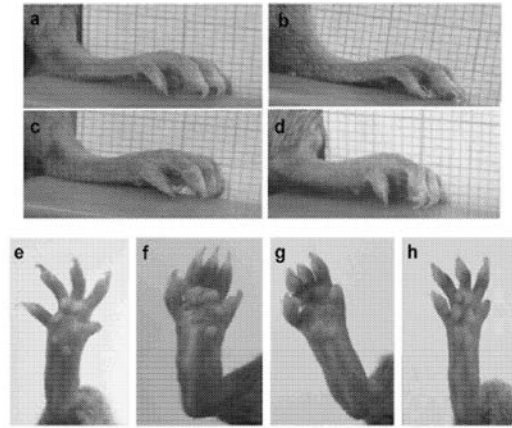


Figure 9

【 図 1 0 】

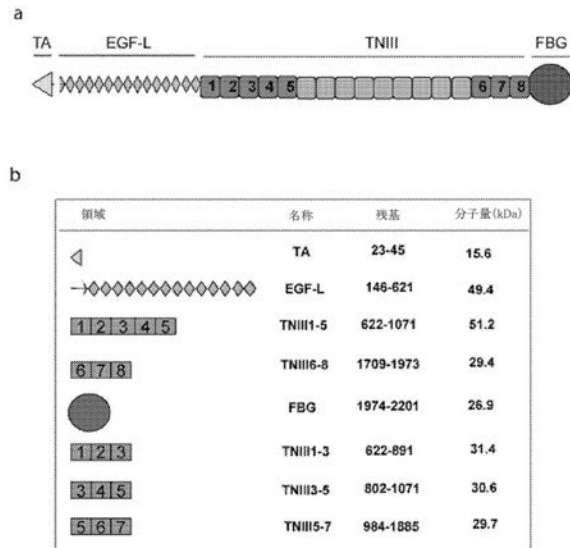


Figure 10

【 図 1 1 】

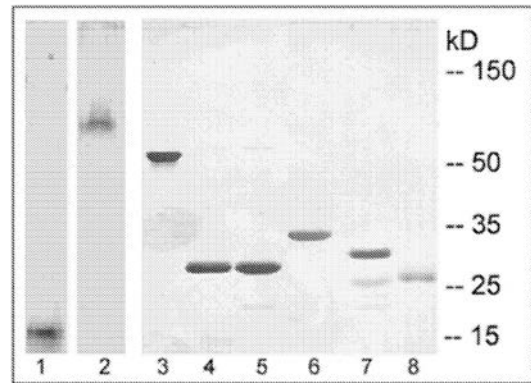
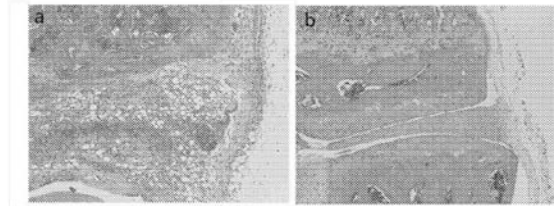
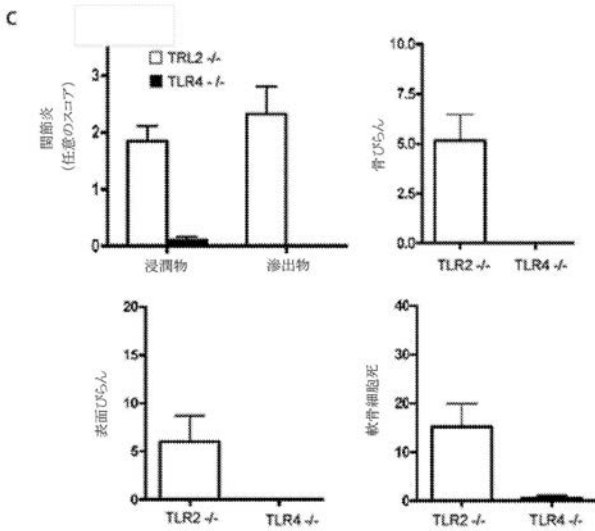


Figure 11

【 図 1 2 - 1 】



【 図 1 2 - 2 】



【 図 1 4 - 1 】

20/44
[配列番号 69]

```

1 attacagagg aaggagctgg ctatataagc cagccaaagt tggctgcacc ggcocacagc
61 tgcctactgt cacocggctc tccocggcgc agatacaagc cccocggctc gtgggcaaaa
121 aggcagcctc gctggggagc tccggggagc gcgcacagtg gaaccocggc agtcccaaca
181 tccaggtact tcttccaagc acctaggtct ctgcgccatc tctctctctc taattctctc
241 aagaagatca gggacaactc atttgaagtc taactctgtc tctcaaatcc ccaattctgc
301 tgaagaatga ataacctaga gccttagagc cccagcagca cccagccaaa cccactctca
361 ccatgggggc catgactcag ctgttggagc gtgtctctct tgccttctct gcctccctca
421 ccgaaggtgg ggtccctcag aaagtcaatc ggcacaagcg acagatgggg tccaagocca
481 cccgtccaga agagaaacag ccaatgggtg ttaaacacgt ttaacaacac aagctccagc
541 tgggatccca gttgtccggt gttctggagt cagccagtggt ggagaaagac ctggcaaccg
601 ctccagagcc cagccaagac tttccggctg acacagtgga tggggaaaac cagatgtctc
661 tcccaactcg catcaactcc cccocccggg cctgtggctg tgcocgagcc cctgattgta
721 aggagctgct gagcagctgc gaggagctgg agaacctggt gtcocgagcc agggagctca
781 gttctgcagg agcagagctc tgtctccagc tctcccaagg ccgctgtggc accagggctc
841 tctgtgcagg tccggggagc tctccagcgc aaggatgtgt ctgtgtctgc gaaacctggc
901 ggaagggccc cagctgctct gagcccgatc gtcocagcca ctgtccactc cagccctggc
961 gcatattagc gcatgcaatc tggcaagctc aactctccc cagagctgc agccagctgg
1021 attcccccag cagctgcaatc tggcagggca aaatctgccc agtgcctgc atctgtttcg
1081 aagctcagc cggagctgac tggctgtgtc cccagatggc agtgcctgc atctgtttcg
1141 acggacatgc tggctgtgtc tggctgtgtc cccagatggc agtgcctgc atctgtttcg
1201 accagctgca gttctcaca aattgtcaca accgtgtggc atctgtttcg aatgactgca
1261 tgtgtgatga gttttccagc ggcgaagctc cagctgactc catctgtccc aatgactgca
1321 tccagccggg cctgtgcaatc aatgtccact gactctgagc cagagagctc accagtgagc
1381 actgcccggc accactctgc ccaactgctc gcccaacca gggccgggtg gagagggggc
1441 actgtgtatg tctgagagcc tttccggctg tggactgagc cagagagagc tctctgtc
1501 actgtcaaaa tctgtggccc tgtgtagagc ggcgggtgca gttgtgatg gtttcaactc
1561 gagctgactc tggagagctc aagttcccca atggctagc tggcactgac cgtgtgtca
1621 atgggcagtg tgtgtgatg gaggtgata ctggggagca ctgcaaccag ctacgtgtcc
1681 caatgactgc tcaagctcag ggcctgtgtc tccggggcca atgtgtatg gagcaagctc
1741 tcaagggtca tgaactgagc gacatgagct gcoctaatga ctgtcaaccg cagcccgctc
1801 gttgtaatgg catgtgtgtc tgtgtagagc gtaacaagcg ggaagactgc ccggatggc
1861 atgtcccagg ggaactgagc acagcggacc tctgtgtgca agtgcctgc ctgtgtgagc
1921 actgcttca cggccctgac tgtgtcagc aatgtgagc aatgtgagc aatgtgagc
1981 gctgctgtg tcaatggagc tgcgtgtgcc atgaagactc tatggcnaa gactgcaagc
2041 agcaaaagtg ggaactgac tttccggctg agggccgctc agtgcctgc cagctctctc
2101 gccacagggc ctccacagc ctgactgtgc gcccaactc ctgcccagct gagcaactc
2161 actatagaca atctgctcag tctactgca tctcaaccg ggtctacag gtaagaactc
2221 gctcagaggt gttctctccc aaagactgca tttgtacaca agtgaagaa gagagactc
2281 actgctgctc ggaacaatg atgocggctc cagatgactc tgtctgtgac accgcccaca
2341 acgaggtgag tctgaaatg cagttctgct tgcctgactc ccaagactcc accatctca
2401 agagctgga cctggtgtg agtaactgta tccgtgata tgcactctgc gagacaaca
2461 agagactccc tgtcagcggc aggtggcca cgtactgaa tgcactgaa aggtgaaat
2521 tcaagctcat cagagacata ctgtgagagc tctgtgtgca tgcactgaa atgtctttg
2581 aaactggga gatcatcttc cggatattga ataaagaaa tgaagggagc atcaaccata
2641 gctgagagag gacacagca tctcaaccg aaaaactgct acgtctggg caagagtatc
2701 acatattctc gocatagtg aaaaaaata cccggggccc tggcctgagc aggtgaca
2761 gccacagctt ggatccccc agccagatc aggtgaaaga tgcacagc accactgctc
2821 tgaactcctg gttcaagccc ctgctctgca tcatgactc tgaactgacc tccagatca
2881 agacagctgc agagaccctc accactgata atctcagca ggaagagacc cagctctca
2941 tccggaaact gaagctgac actgagtagc aggtgtccct catctccgc agaggtgaca
3001 tgtcaagcaa cccagccaaa gagaactcca caacaggctc cgtgctccc agaatcttc

```

Figure 14

【 図 1 3 】

TA ドメイン [配列番号 65]
23 gvlkkvir hkrqsgvnat lpeen 45

EGFL ドメイン [配列番号 66]
146 cclqp atgrldtrpf csgrgnfste ggcvccepww
181 kgnpcsepec pgnchlrgro idgqcioddg ftgedccsqa cpadcondgk cvngvcife
241 gyagdcarsc lcpvpcseeh gtcvdglcvc hdgfdgdcn kpclinnnyn grvencvec
301 cdvdfgtgdc selicpndcf dgrcraingtc yceedftged ogkgtphac htqgrceegq
361 cvddegfagl dcsekrpcad chnrgrcvdg rcecdgftg adcgelkpcn gcsghgrvcn
421 ggcvcdeggt gedcaqlrcc ndchszgrcv egkvcceqgt kygdcdsmac pndchghgrc
481 vngmrvcdgd ytgedcrrdq cprdcnrgl cvdgcvcved gftgpdcacel spndchggq
541 rcvngqcvch egfmgkckce qrcpsdchqg grcvdgcqic hefgtgldeg qhscpsdcnn
601 lqcvsvgrcl cneqysgedc s 621

FNIII ドメイン [配列番号 67]
622 evspkdlv vtvetetvnl lawdnemrvt eylvvtypth
661 egglemqfrv pgdqsttiq eilepgevfyi rvfaillenkk sipvsarvat ylpapeglkf
721 ksiketsvev ewpdliafe tweiffrnmn kedegektks lrrpetsyrc tglapggvce
781 ilshivkntm rpgplkrvtc tldapsqie vkdvtdttal itwfkplaei dgieltiyk
841 dvpqdrttid ltedenqysi gnlpdteye vslisrgdm snpakettf tgladprnl
901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrikyapi agdhvaevdr pksqgattk tltglrptg
961 lptgqsvavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets tlllwktpia kfdyrlnys
1021 lptgqvqvqg lprnttsyvl rglepgeqyn vlltaekgrh kskprvarkas teqapeleni
1081 vtvevgwdgl rlnwtaadga yehfiigvqe ankveaarml tvpgsrlavr ipglkaatpy
1141 tvsiyvgivq yrtpvlsaea stgetpnlge vvvaevqkda lklntwapeg ayeyffivqg
1201 eadveeaqgn ltpvgglrst dlplkaath ytitirgvtq gdlavsevqg dglrlnwta
1261 nltvteawsd alrlnwttpp gtydqftiqv qeadqvveah nltvpgalsr meiplragt
1321 pyvtllhgev rghstrplav evvtedlplq gdlavsevqg dglrlnwta dmayhvfq
1381 vqevnkveaa qnltpgsrlr avdipgleaa tpyrvsiyvg irgyrtpvls aeastakepe
1441 ignlvnsdit pesfnlswa tdgiffetti eidnrlle tveynisgae rtahisglpp
1501 stdfivylsg lapsirtkti satattealp llenltisdi npygtvswm asenaadfll
1561 vtvdvsgkll dpqeftlsgt qrklelrgli tggivevmsv gftgqhtkpk lraeviteae
1621 pevdhllvsd atpdgflwv tadegvfdnf vlkirdtkkq sepelitlla pertrtdgl
1681 reateyeiel ygiskgrsq tvsaiattam gskpvfisd itensatvaw raptaqvief
1741 rityvptggg tpsmvtdgt ktqtrlvkli pgveylsvii amkgeesep vsgsttald
1801 gspvltvni tdealarwq palatvdsyv isytekvpe itrvtsgntv eyaltdlepa
1861 teytlrifae kppqksstt akfttdldsp rdlatevqs etalltwrpp rasvtyllv
1921 yesvdgtvke vivgpdttisy sladlspsth ytakigalng plrsnmqiti ftt 1973

FBG ドメイン [配列番号 68]
1974 iglllypf
1981 pkdcsqamln gdttsglyti ylngdkaqal evfcdmtdsg ggwivflrkk nrgenfygnw
2041 kayaaqfgdr reefwlgldn lnkitagqgy elrvldrdhg etafavdyktf svgdaktryk
2101 lkveqysgta gdsamayhnr sftfdktdt saltncalsy kgafwyrnch rvlmrgzygd
2161 nnhsgqvnwf hwkghehsiq faemklrpsn frnlegrzkr a 2201

Figure 13

【 図 1 4 - 2 】

```

3061 gacgtgttcc ccagacagat aaacagcatca cccctggaatg gaggaaatgc aaggaagcta
3121 ttgacagtta cagaattaag tatgcccoca tctctggagg gaccaccgtc gaggttgatg
3181 tccaagaag ccaacsaagc caacaacaaa cccactctac aggtctgagg ccgggaactg
3241 aatagggat tggagttctc gctgtgaaag aagacaagga gagaatcca ggcacacata
3301 agcagagctc agagltggac agcccaaggg accctcaggt tctgaaact gaaagaccca
3361 gctggaactc gctctgaaag aaccctggg ccaattttga ccgtaccgct ccaattaca
3421 gctcaccac aggcagtggt gttggagtgct agtctccagc aaacacactc tcatgtctc
3481 tgaagagctc gaaacagga caggagatac atgtctctct gacagccagc aaaggaagac
3541 caaagagaaa ccccgacgtc gtaagacctc caactgaaca accctcagct cctgaaacac
3601 tcaactgac tgaagttgct tggatggccc tcaactgaca ctggaccgca gctgaccagc
3661 cctatagaca cttatcattc caggtcagc aggcacaaca ggtgaggaca gctggaacac
3721 tcaactgccc tggcagctc cgggtgtggt acataccggg cctcaagctc gctacgctc
3781 atacagctc catctatggg gtagctcagg gctatagac accagctgct tctgtgagg
3841 cctccacagg gaaactccc aattgggagc aggtctgtgt gcccagagtg cctgtggatg
3901 cctcaaacct caactgactc gctccagaag gggctctgca gactctttc atcaggtgc
3961 agagagctga cacagttagc gaaccocaga acctcaacct ccacagagga ctgagttcca
4021 cagactgccc tgggtccaaa gcaaccactc attataactc caccatccc ggggttaactc
4081 agacttcaag caacaacctc ctctctgttg aagtctgaga agagagaggt ccaagatgct
4141 gaaactcaac agtgaaccag gtagctggg atgtctctag actgaactg actgaactg
4201 atgaaacta tgaaccgtt actatcagg tccagaggc tgaaccagtg gaaagagctc
4261 acaactcaac gttctctgag agctcgtctc ccatgaaatc cccagctcag aggtctgca
4321 ctctctaac agtcaacctc cagccagagc caaggggcca cagactcga cccctgtctc
4381 tagagctgtc caagagatc ctccacagc tggagattt accgctgtct taggtgtctc
4441 gggatggcct cagactcaac tgaaccagc ctatgagctc ctatgtcttc tttgtcttc
4501 aggtgagga ggtcaacaaa gttgagcag cccagactc cagctgtctc ggcagctca
4561 gggctgtgga catcccgggc ctccagctc ctccagctc ctccagctc atctatggg
4621 tgaactggg ctagaaca ccaactctc ctgtctgagc ctccagctc aaagacctg
4681 aaatggaaa cttaagtgtc tctgacata ctccagagc ctccagctc tctgtgatg
4741 ctaccagtg gatctctgag accttacc a tgaactatc tgatccaat aggtgtgag
4801 agactgtgga atataatctc tctgtgctg aacgaactgc ctactctca gctgaccctc
4861 ctactgtagc ttttatgtc taactctctg gactgtccc cagactccgg accaaaccca
4921 tcaagtcoc agccaagca gaggccctgc cctctctagg caaactcaac atcttagca
4981 ttaactccca cgggttca ca gttctctgca tggcatcga gaatgctctc gacagcttc
5041 tagtaacggt ggtgattctc ggaagctgc tggacccca ggaattca cttcagaaa
5101 cccagagaaa gctggagctc agagcctca taactggcca tggctatag gttatgctc
5161 ctggttacc ccaaggctc caaacagc cctgagggc tgaattttc acagagccg
5221 acccagaggt tgaacactc ctggtttag atgcaaccac agagctttc cgtgtgctc
5281 ggaacagctg tgaagggtc ttagcaactc tttcttcca aatcagatc accaaagac
5341 agtctgagcc actggaata acctactg tggcccaagc taaccagac ataacagctc
5401 tcaagagggc tactgaatac gaattgaa cctatgattc aagcaagga aggcactccc
5461 agacagtcag tctatagca caaacagca tggctcccc aaggaagctc attttctc
5521 acatcactga aaattggctc actgctgctc gggagggccc cacagctc agtgaagctc
5581 tccagattac ctatgtgccc attacagga gttaccctc tagtaccctc atgtgagaa
5641 caagactca gaccagctg gtaaacctca taactggctc ggaactctc ctgacatca
5701 tggcctgaa gggctttagc gaaagtgaac ctctcaggtc gctactcaac acagctctg
5761 atgcccactc tggcctggtc acagccaaca tcaactgctc aagagctgtc gccagctg
5821 agcaagcact tgcactgtg gacagttatg tcaatctca caagagctg aaagtccagc
5901 aaatcagcc caggtgtcc ggaacacag tggagtagct tctgaccgc ctgacgctc
5941 ccaaggaata cacactgaga atctttagc agaaaggccc ccaagagagc tcaaccatca

```

Figure 14 (con't)

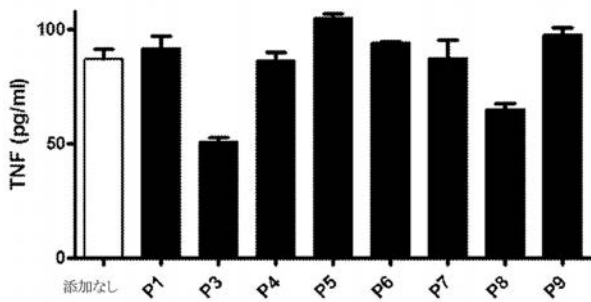
【 図 1 4 - 3 】

```

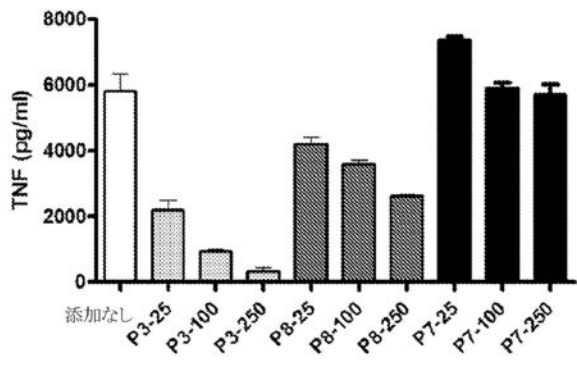
6001 ctgccaaagt cacaacagac ctcgattct caagagact gactgctact gaggttcagt
6061 cggaaactgc cctccttacc tggcgacccc cccgggcatc agtcaccogt tacctgtctg
6121 tctatgaatc agtggatggc acagtcaagg aagctattgt ggtccagat accacctctc
6181 acagctgggc agactgagc ccatccaccc actacacagc caagatccag gcactcaagt
6241 ggcccctgag gagcaatag atccagacca tctcaccac aatggactc ctgtaccctc
6301 tcccacaagg ctgtcccaa gcaatgtgca atggagacac gacctctggc ctctacacca
6361 ttatctgaa tgggataag cctgagcgc tggaaagtct ctgtgacat accctgtgat
6421 ggggtggatg gattgtgtc ctgagacga aaaaaggcag cgagaacttc taccaaaact
6481 ggaaggcata tctgtggga ttggggacc gcagagaaga attctggctt gggctggaca
6541 acctgaacaa aatcaacgac caggggcagt acgagctccg ggtggacctg cgggacctg
6601 gggagacagc ctttgtgtc tatgacaagt tcagcgtggg agatgccaa gactgtaca
6661 agctgaaggt ggaggggtac agtgggacag cagggtgactc catggctacc cacaatggca
6721 gatcctctc cactttgac aaggacacag attoagccat cccaactgt gctctgtct
6781 acaaaagggc tttctgtac aggaactgtc accgtgtcaa cctgatgggg agatagggg
6841 acaataacca cagtcaaggc gttactgggt tccactggaa gggccacgaa cactcaatcc
6901 agtttctgca gatgaagctg agaccaagca acttcagaaa tcttgaaggc agggcaaac
6961 gggcataaat tccaggacc actgggtgag agaggaataa gggccagagc gaggaaagga
7021 tttaccacaa gcatcaatc aaccagccca accatcgctc cacactggg catttggta
7081 gagtcaaacg tgaccatgga tccctggggc caacggcaac agcatgggoc tcaoctctc
7141 tgtgattctc tctttgac caaagacatc agtctccaac atgtttctgt tttgtgttt
7201 gatcoagcaa aaotococa gtgacaacat cgcgaatggt ttttactctc ottaggtgoc
7261 tctgggaatg ggagaggggt aggatgtaca ggggtagttt gtttagaacc cagcgtatt
7321 ttacatgaag ctgtataatt aattgtcatt attttgtta gcaaaagata aatgtgcat
7381 tggagccat cctttttttt acatttcata caacagaaac cagaaaagca atactgtttc
7441 cattttaagg atatgattaa tattattaat ataataatga tgatgatgat gatgaaact
7501 aaggattttt caagagatct tctttccaa aacattctcg gacagtacct gattgtatt
7561 tttttttaa taaaagcaca agtaactttg agtttgttaa aaaaaaaaa aaaaaa

```

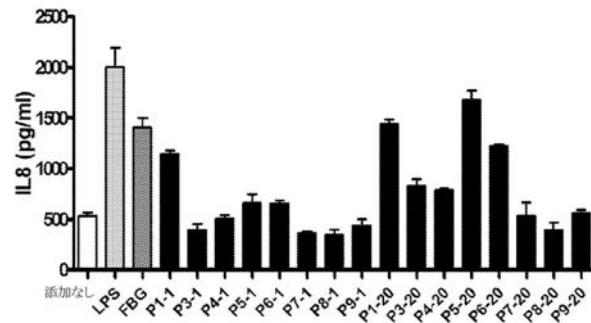
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】

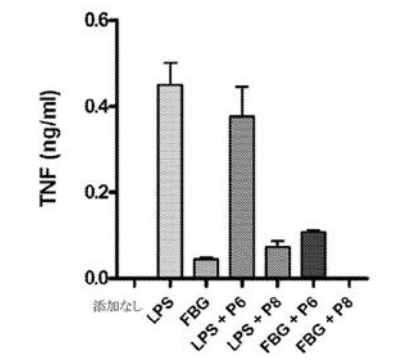
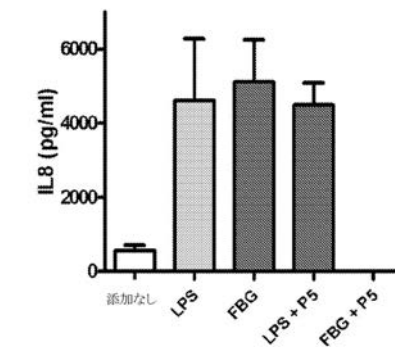


Figure 18

【 図 1 9 】

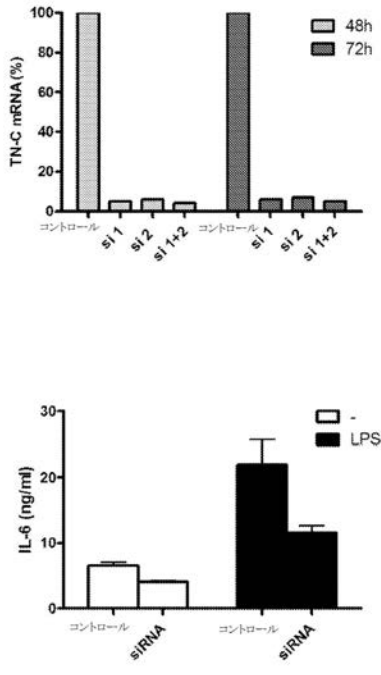
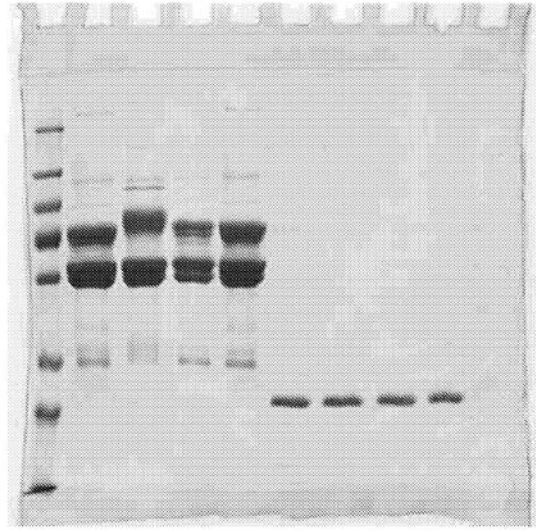
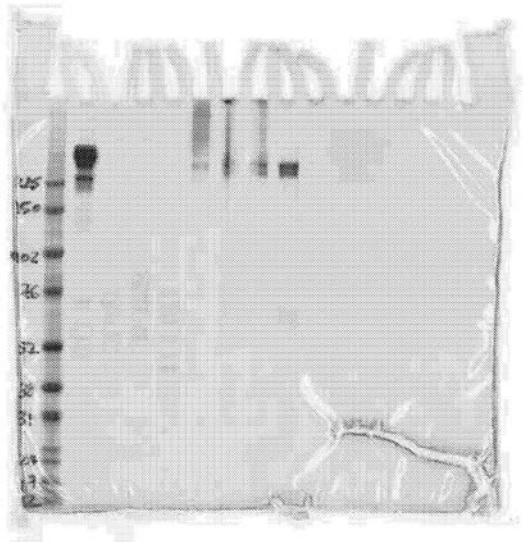


Figure 19

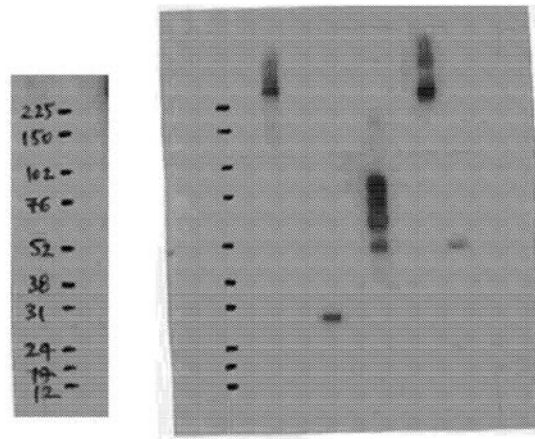
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【 図 2 3 】

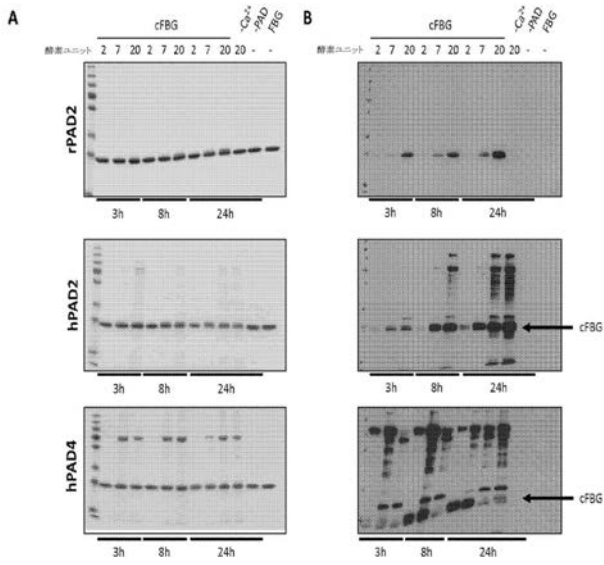
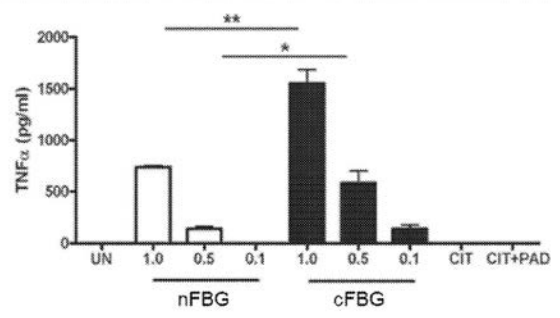
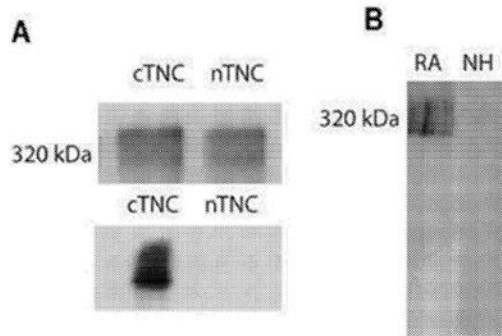


Figure 23

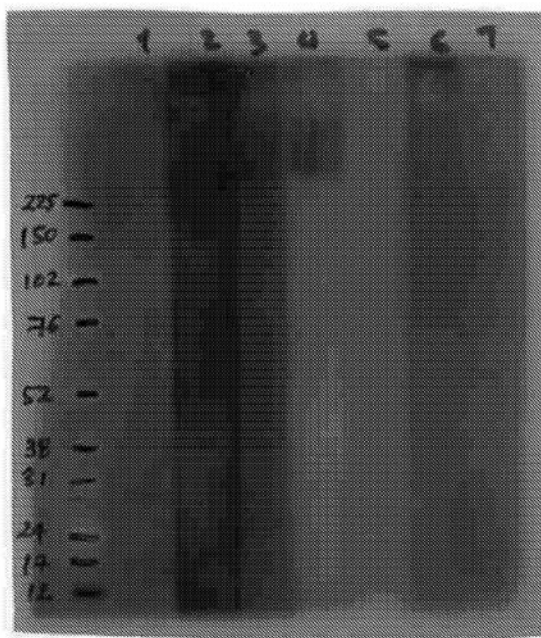
【 図 2 4 】



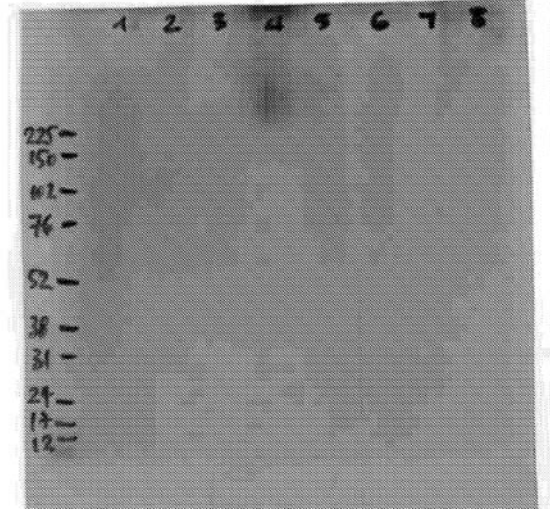
【 図 2 5 】



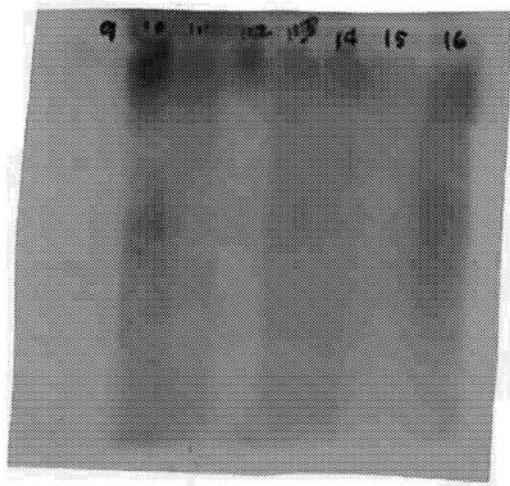
【 図 2 6 】



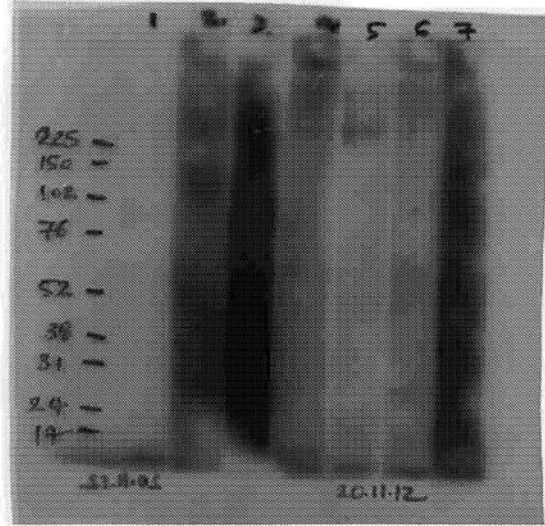
【 図 2 7 】



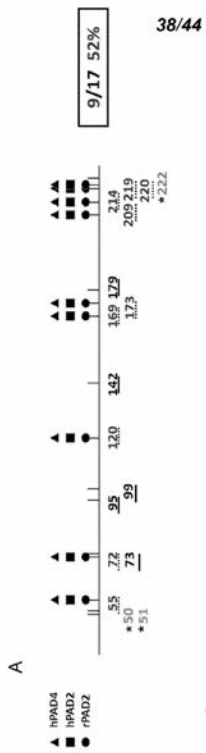
【 28 】



【 29 】



【 30 】



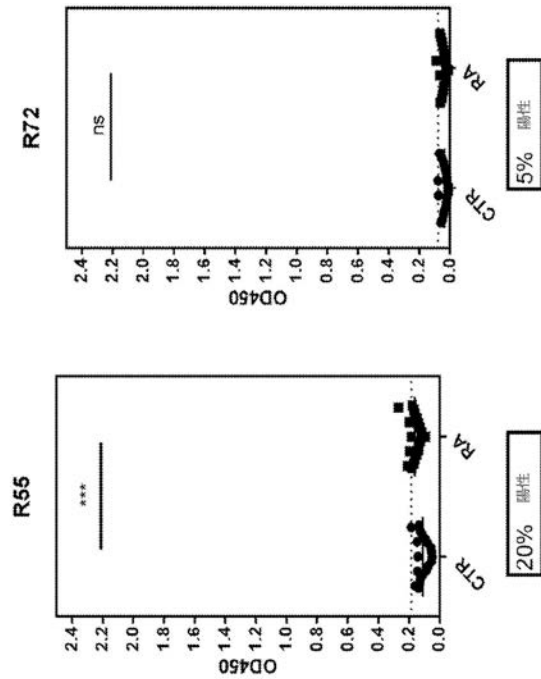
B

PFKDCQAMLNQDTSGLYIYLNQDKAEALEVFCDMTSDGGGWIVLRRKNGRE
 NFYQNWKAYAGFGDRREEFWLGLDNLNKITAGQYELRVDLRDHGETAFAYDKF
 SVGDAKTRVYKLVGEGYTAGDSMAYHNGRFSFDKDTDSAITNCALSFKGAFWYE
 NCHRVNLMGRYDNNHSQGVNWFHWKGGHEHSIQFAEMKLRPSNFENLEGRKR

[SEQ ID NO: 70]

Figure 30

【 31 - 1 】



【 3 1 - 2 】

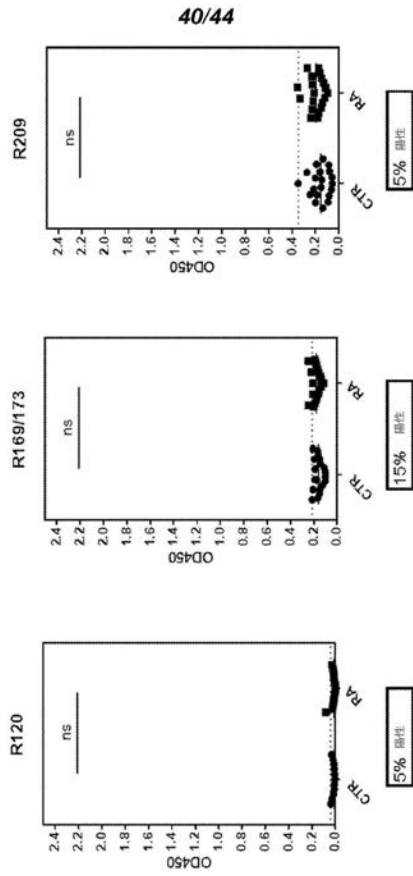


Figure 31 (cont'd)

【 3 1 - 3 】

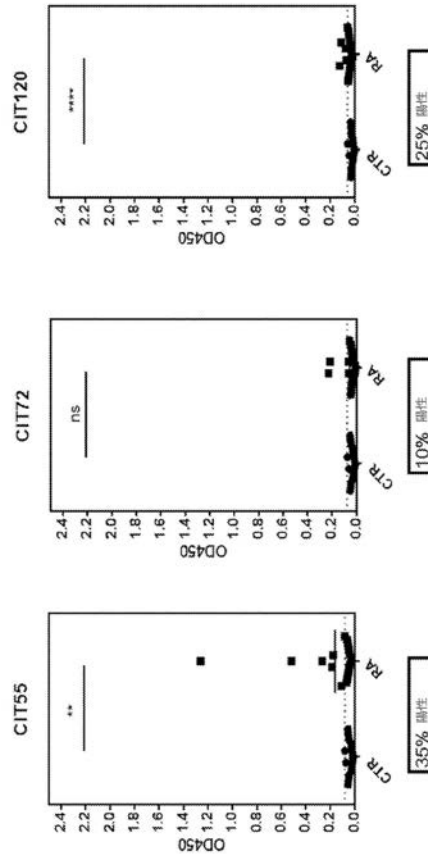


Figure 31 (cont'd)

【 3 1 - 4 】

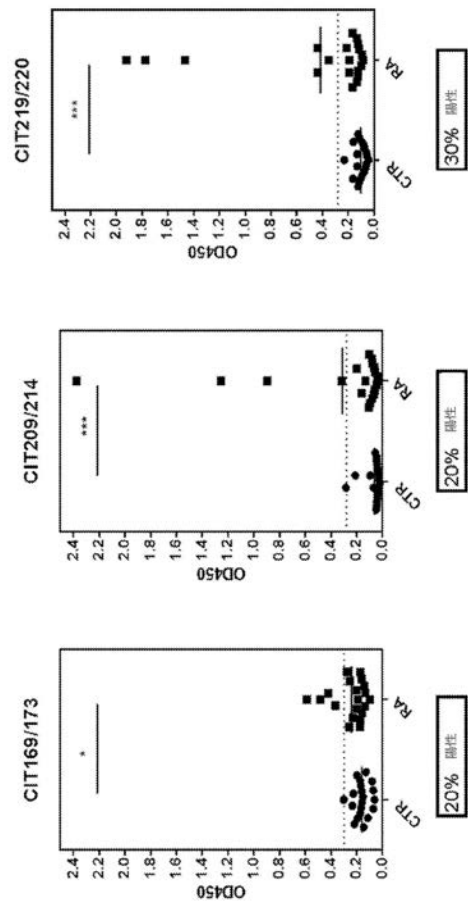
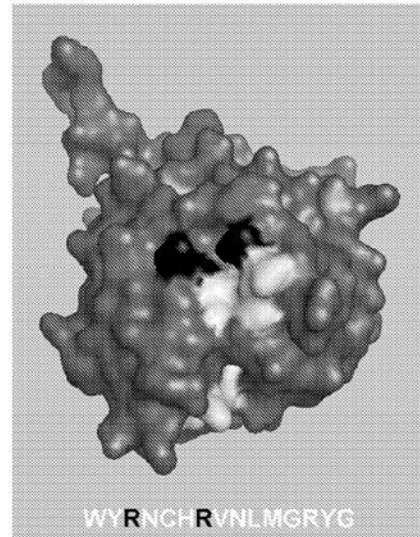


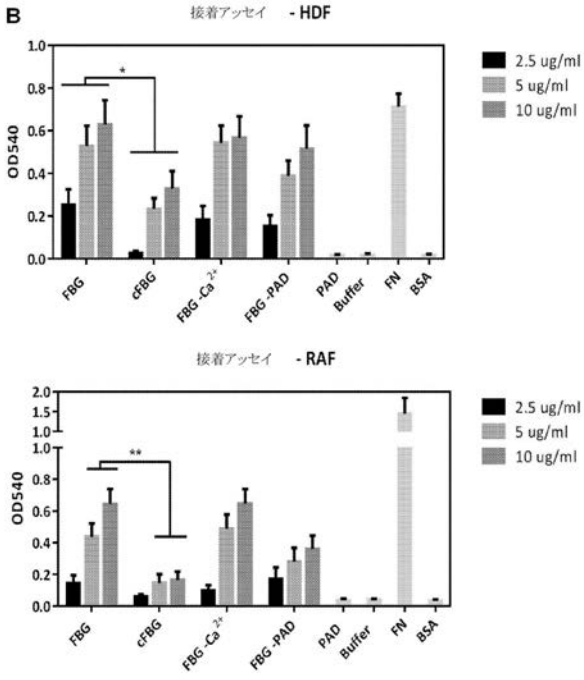
Figure 31 (cont'd)

【 3 2 - 1 】

A



【 図 3 2 - 2 】



【 配 列 表 】

[2017507337000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2015/050052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2004 138489 A (MENEKI SEIBUTSU KENKYUSHO KK; JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY) 13 May 2004 (2004-05-13) the whole document, in particular claims; paragraphs [0034] and [0038]; examples; abstract	1-17
A	WO 2013/088140 A2 (ISIS INNOVATION [GB]) 20 June 2013 (2013-06-20) cited in the application the whole document	1-17
	----- -/-- -----	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
2 April 2015		20/04/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Weber, Peter

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/050052

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NATALIA WEGNER ET AL: "Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis", IMMUNOLOGICAL REVIEWS, vol. 233, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 34-54, XP055143800, ISSN: 0105-2896, DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00850.x cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>CHIQUET-EHRISMANN R ET AL: "Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress", JOURNAL OF PATHOLOGY, JOHN WILEY & SONS LTD, GB, vol. 200, no. 4, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 488-499, XP002594134, ISSN: 0022-3417, DOI: 10.1002/PATH.1415 [retrieved on 2003-07-01] cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>JEFFREY R GULCHER ET AL: "Structure of the human hexabrachion (tenascin) gene", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 88, 1 November 1991 (1991-11-01), pages 9438-9442, XP055180477, the whole document</p> <p>-----</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/050052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2004138489 A	13-05-2004	JP 3837374 B2 JP 2004138489 A	25-10-2006 13-05-2004
WO 2013088140 A2	20-06-2013	CN 104105967 A EP 2791686 A2 JP 2015503106 A KR 20140109956 A US 2014322211 A1 WO 2013088140 A2	15-10-2014 22-10-2014 29-01-2015 16-09-2014 30-10-2014 20-06-2013

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 キム・スザンヌ・ミッドウッド

英国オーエックス3・7エフワイ、オックスフォードシャー、オックスフォード、ヘディントン、ルーズベルト・ドライブ、ユニバーシティ・オブ・オックスフォード、ケネディ・インスティテュート・オブ・ルーマトロジー

(72) 発明者 パトリック・ジョン・ベナブルズ

英国オーエックス3・7エフワイ、オックスフォードシャー、オックスフォード、ヘディントン、ルーズベルト・ドライブ、ユニバーシティ・オブ・オックスフォード、ケネディ・インスティテュート・オブ・ルーマトロジー

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB15 CC01 FA12

4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ79 QR48 QR72 QS07 QS33 QX01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA50 EA54 FA71

