

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6158825号
(P6158825)

(45) 発行日 平成29年7月5日(2017.7.5)

(24) 登録日 平成29年6月16日(2017.6.16)

(51) Int.Cl.	F 1
G 0 1 N 33/68	(2006.01) G 0 1 N 33/68
G 0 1 N 33/53	(2006.01) G 0 1 N 33/53
A 6 1 P 29/00	(2006.01) A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 19/02	(2006.01) A 6 1 P 19/02
A 6 1 K 45/00	(2006.01) A 6 1 P 29/00

請求項の数 26 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-546631 (P2014-546631)
(86) (22) 出願日	平成24年12月12日 (2012.12.12)
(65) 公表番号	特表2015-503106 (P2015-503106A)
(43) 公表日	平成27年1月29日 (2015.1.29)
(86) 國際出願番号	PCT/GB2012/053104
(87) 國際公開番号	W02013/088140
(87) 國際公開日	平成25年6月20日 (2013.6.20)
審査請求日	平成27年10月22日 (2015.10.22)
(31) 優先権主張番号	1121280.0
(32) 優先日	平成23年12月12日 (2011.12.12)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)
(31) 優先権主張番号	1214806.0
(32) 優先日	平成24年8月20日 (2012.8.20)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)

(73) 特許権者	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 英國 オーエックス2 オジエイビー オ ックスフォード ボトリー ウエスト ウ エイ3 バクストン コート
(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 瞳
(74) 代理人	100138900 弁理士 新田 昌宏
(74) 代理人	100162684 弁理士 吳 英燐

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】テネイシンCおよび関節リウマチにおけるその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の関節リウマチの診断を補助する方法であって、以下のステップ：

- (a) 該患者由来の血液サンプル中のテネイシンCのレベルの決定すること；および
(b) ステップ(a)で決定したテネイシンCのレベルを1以上の参照値と比較することを含んでなる方法。

【請求項 2】

患者におけるびらん性関節リウマチが進行する危険性または抗TNF療法に対する関節リウマチの応答の決定を補助する方法であって、以下のステップ：：

- (a) 該患者由来の血液サンプル中のテネイシンCのレベルの決定すること；および
(b) ステップ(a)で決定したテネイシンCのレベルを1以上の参照値と比較することを含んでなる方法。

【請求項 3】

抗TNF療法がインフリキシマブ療法である請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

関節リウマチ患者に適した治療の決定を補助するための方法であって、以下のステップ：

- (a) 該患者由来の血液サンプル中のテネイシンCのレベルの決定すること；および
(b) ステップ(a)で決定したテネイシンCのレベルを1以上の参照値と比較することを含んでなり、

10

20

テネイシンCレベルが参考値以下であるとき、該適した治療は抗TNF療法であり、
テネイシンCレベルが参考値よりも高いとき、該適した治療は、抗IL17抗体、T細胞
共刺激モジュレーター、IL-6阻害剤、抗CD20抗体、janusキナーゼの阻害剤
または脾臓チロシンの阻害剤の使用から選択される、方法。

【請求項5】

抗TNF療法がインフリキシマブ療法である請求項4に記載の方法。

【請求項6】

関節リウマチがびらん性関節リウマチである、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

関節リウマチ患者がびらん性関節リウマチを有しているかどうかの決定または診断の補助に使用するための請求項1記載の方法。 10

【請求項8】

血液サンプルが、全血、血清または血漿サンプルである、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

参照レベルと比較して血液サンプル中のテネイシンCの50%以上の増加が、関節リウマチの診断を補助する、又はびらん性関節リウマチが進行する危険性の決定を補助する、請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

関節リウマチの診断がびらん性関節リウマチの診断である、請求項9に記載の方法。

20

【請求項11】

前記参照レベルが正常な血液サンプルにおけるレベルである、請求項9または10記載の方法。

【請求項12】

テネイシンCが血清1ml当たり33ngを超えるレベルで、関節リウマチと診断される、請求項1～11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

関節リウマチがびらん性関節リウマチである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

テネイシンCが血清1ml当たり31ngを超えるレベルで、関節リウマチと診断される、請求項1～11のいずれかに記載の方法。

30

【請求項15】

関節リウマチがびらん性関節リウマチである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

インピトロで行われる請求項1～15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】

患者が哺乳動物である、請求項1～16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】

哺乳動物がヒトである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

びらん性関節リウマチの血清バイオマーカーとしてのテネイシンCの使用。

40

【請求項20】

患者の関節リウマチの診断を補助する手段としての、血液サンプル中のテネイシンCのレベルの決定の使用。

【請求項21】

関節リウマチがびらん性関節リウマチである請求項20に記載の使用。

【請求項22】

血液サンプルが血清サンプルである請求項21に記載の使用。

【請求項23】

関節リウマチの治療のための、請求項1～4のいずれかに記載の方法の使用。

50

【請求項 2 4】

関節リウマチがびらん性関節リウマチである、請求項2 3に記載の使用。

【請求項 2 5】

患者からの血液サンプル中のテネイシンCのレベルが参考値よりも高いが、33 ng / mL未満である場合、抗TNF療法が適当であることを示す、請求項2 3または2 4に記載の使用。

【請求項 2 6】

患者からの血液サンプル中のテネイシンCのレベルが33 ng / mLを超える場合、抗TNF療法が適当でないことを示す、請求項2 3または2 4に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0 0 0 1】**

本発明は、炎症性疾患のためのバイオマーカーとしての、特に関節リウマチのための血清バイオマーカーとしてのテネイシンCの使用に関する。特に、本発明は、びらん性関節リウマチ(er erosive rheumatoid arthritis)のためのバイオマーカーとしてのテネイシンCの使用に関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

テネイシンCは、パターン認識受容体TLR4の活性化により初代ヒトマクロファージおよび滑膜線維芽細胞における炎症性サイトカイン合成を誘導する、炎症誘発性細胞外マトリックス糖タンパク質である(Midwood et al (2009) Nat. Med. 15: 774-780)。テネイシンCは分子量1,500,000Daの大きな六量体のタンパク質である。例えば慢性関節リウマチ患者の滑液や腫瘍間質において高レベルのテネイシンCがみられる。

20

【0 0 0 3】

関節リウマチは、長期の炎症、腫れ、複数の関節の痛みを特徴とする慢性疾患である。慢性的な炎症が時間とともに関節内の骨の破壊および進行性の障害につながる。関節リウマチの1つの顕著な特徴は、その臨床症状の幅広い多様性である。多様性は、疼痛のレベル、腫脹関節の数と関節の変形の程度にまで及ぶ。同様に、ある特定の医学療法に対する関節リウマチ患者の応答もまた広く様々で、疾患の兆候や症状がほぼなくなる患者もいれば、ほとんど応答しない患者もいる。

30

【0 0 0 4】

関節リウマチの現在の診断法は、米国リウマチ学会によって設立された、以下の項目で構成されるものである：

- 1) 朝のこわばりが1時間以上続く(主に指)；
- 2) 3か所以上の関節の腫れ；
- 3) 手(手首、中手指節関節と近位指節間関節)の関節の腫れ；
- 4) 左右対称の関節(左右の関節)の腫れ；
- 5) 手のX線写真の異常所見；
- 6) 皮下結節；および
- 7) リウマチに関するCRP(C反応性蛋白質)または抗CCP(抗環状シトルリン化ペプチド)の血液検査による陽性

40

上記の4つを超える項目が該当する場合、関節リウマチと診断される。

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0 0 0 5】**

本発明の目的は、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの同定に便利に用いることができる、代わりとなるマーカー、診断剤および検出方法を提供することである。

【0 0 0 6】

びらん性関節リウマチは、関節リウマチ患者における身体障害の主な原因であり、骨量の減少および関節骨の局所的崩壊によって特徴付けられる。

50

【0007】

生検による病変の直接的な評価が実用的であることは非常にまれであるので、骨びらんの判定は、ほぼ専らX線所見、超音波やドップラー法での試験に基づいている。用語「骨びらん」は一般的に皮質ライニングにおける不連続を伴う傍関節部位でのミネラル組織の喪失を記述するものである。骨びらんは、疾患の初期から始まり、最初の1年で最も急速に進行するので、びらん性関節リウマチを迅速に検出し治療することができれば、非常に有益であろう。

【課題を解決するための手段】

【0008】

第一の態様によれば、本発明は、以下のステップを含む、患者の炎症性疾患の状態を決定する方法を提供する。 10

(a) 該患者由来のサンプル中のテネイシンCのレベルの決定し；および

(b) ステップ(a)で決定したテネイシンCのレベルを1以上の参照値と比較する。

【0009】

炎症性障害は、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチ、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、狼瘡および筋炎の1以上であります。好ましくは、炎症性疾患は、関節リウマチであり、特にびらん性関節リウマチである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

好ましい実施形態において、本方法は、患者の関節リウマチ状態、およびより好ましくは、患者のびらん性関節リウマチの状態を決定するために使用される。びらん性関節リウマチは、関節の骨の少なくとも1つのびらん性病変、好ましくは少なくとも5つの病変、好ましくは少なくとも10個の病変、好ましくは少なくとも20個の病変が存在する、関節リウマチと定義される。病変の数が多いほどより重度のびらん性関節リウマチである。 20

【0011】

本発明の方法は、既に慢性関節リウマチであると診断された患者のびらん性関節リウマチの状態を決定するために使用され得る。好ましくは、本発明の方法は、関節リウマチ患者のびらん性関節リウマチの状態を簡単に非侵襲的にかつ安価に調べる方法を提供する。

【0012】

サンプルは、全血サンプル、血漿または血清などの血液サンプルであってよい。別の実施形態では、サンプルは尿であってよい。好ましくは、試料は血清サンプルである。 30

【0013】

好ましくは、本方法は、患者がびらん性関節リウマチを有するかどうかを決定するために用いられる。

【0014】

テネイシンCは、炎症性疾患、特に関節リウマチ、及びより具体的にはびらん性リウマチ性関節炎の新規な血清バイオマーカーである。

【0015】

ヒトテネイシンCのタンパク質配列は、アクセシション番号P24821を用いてGenBankで見つけることができ、アミノ酸配列は図8に示される。 40

【0016】

本発明の方法ではテネイシンCのあらゆる形態を測定しうる。好ましくは、少なくともテネイシンCの320kDaのアイソフォームが測定される。好ましくは、テネイシンCの320kDaアイソフォームのみが測定される。

【0017】

用語「炎症性障害の状態」には、炎症性障害の任意の識別可能な症状が含まれる。例えば、炎症性疾患の状態には、炎症性疾患の存在または非存在、炎症性疾患を発症する危険性、炎症性疾患のステージ、炎症性疾患の進行、および炎症性疾患の治療に対する患者の有効性または応答が含まれるがこれらに限定されない。

【0018】

本発明の方法は、例えば、以下の任意の1以上のために用いることができる：患者における炎症性障害を診断すること；患者が炎症性障害を発症する可能性を評価すること；炎症性障害を有する患者の予後について助言すること；疾患の進行をモニターすること；および炎症性障害のための治療に対する患者の有効性または応答をモニターすること。

【0019】

好ましくは、本方法は、患者が提供するサンプル中のテネイシンCのレベルの分析から、患者における炎症性障害の診断が可能である。

【0020】

用語「関節リウマチの状態」には、任意の識別可能な症状が含まれる。例えば、関節リウマチの状態には、関節リウマチの存在または非存在、関節リウマチを発症する危険性、関節リウマチのステージ、関節リウマチの進行、および関節リウマチの治療に対する患者の有効性または応答が含まれるがこれらに限定されない。好ましい実施形態では、関節リウマチの状態は、びらん性関節リウマチの有無を指す。

10

【0021】

本発明の方法は、例えば、以下の任意の1以上のために用いることができる：患者における関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチを診断すること；患者が関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチを発症する可能性を評価すること；関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチを有する患者の予後について助言すること；疾患の進行、特にびらん性関節リウマチの進行をモニターすること；および関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチのための治療に対する患者の有効性または応答をモニターすること。

20

【0022】

好ましくは、この方法は、患者によって提供されたサンプル中のテネイシンCのレベルの分析から、患者における関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの診断が可能である。

【0023】

サンプル中のテネイシンCの存在のレベルは、イムノアッセイ、分光分析、ウェスタンプロット、ELISA、免疫沈降、スロットまたはドットプロットアッセイ、等電点電気泳動、SDS-PAGEおよび抗体マイクロアレイ免疫組織染色、ラジオイムノアッセイ(RIA)、蛍光イムノアッセイ、アビジン-ビオチン又はストレプトアビジン-ビオチン系を用いるイムノアッセイなど、またはそれらの組み合わせを含む群のいずれかの使用を含みうる任意の適切なアッセイによって決定することができる。これら的方法は、当業者に周知である。

30

【0024】

あるいは、テネイシンCのレベルは、サンプル中のテネイシンC mRNAレベルを決定することによって測定することができる。mRNAレベルは、PCRまたは任意の他の適当な技術によって測定することができる。

【0025】

好ましくは、それに対してテネイシンCの測定されたレベルが比較されるところの参照値は、関節リウマチ等のいかなる検出可能な炎症性疾患、または関節リウマチ等の炎症性障害のいかなる臨床症状も有しない1以上の患者において観察されるテネイシンCのレベルであり、いわば、バイオマーカーテネイシンCの「正常値」と呼ばれるものである。

40

【0026】

好ましくは、正常な組織サンプルにおけるレベルと比較して、サンプル中のテネイシンCの約50%以上の増加は、炎症性疾患、例えば関節リウマチの診断、および特にびらん性関節リウマチと診断される。

【0027】

好ましくは、血清または血漿の1mlあたりテネイシンCのレベルが、31ng、好ましくは33ngを超えるレベルは、慢性関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチ、と診断されるかまたは少なくともその指標となる。好ましくは、テネイシンCのレベルを他のマーカーと組み合わせは、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの診断を可能にする

50

ものである。

【0028】

あるいは、参照値は、特定の患者について得られた以前の値であってもよい。この種の参照値は、本方法が特定の処置に対する患者の応答をモニターするために使用される場合に用いることができる。

【0029】

好ましくは、正常／非疾患参照レベルと比較して、テネイシンCのレベルの増加は、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの指標かまたは診断とされる。

【0030】

テネイシンCのレベルは、関節リウマチ患者をびらん性関節リウマチを有する患者とそうでない患者に分類するために用いることができる。

【0031】

本発明の方法はまた、関節リウマチの進行および特にびらん性関節リウマチの進行および／または患者に投与した治療の有効性をモニターするために使用することができる。これは、最初の診断の後、種々の時点で患者から採取したサンプルを分析し、テネイシンCのレベルの変化をモニターし、正常および／または参照値とこれらのレベルを比較することによって達成することができる。この場合、参照レベルは、その患者における最初のバイオマーカーレベル、またはその患者の前回試験のバイオマーカーレベル、またはその両方を含み得る。

【0032】

本発明の方法はまた、患者に適切な治療法を決定するために使用することができる。この方法は、個人向けの薬物療法を提供するために用いることができる。一実施形態では、リウマチ性関節炎などの炎症状態と診断するのに十分なサンプル中の増加したテネイシンCレベルは、その患者には有効でないとみられる抗TNF薬を使用することは適切ではないことを示すのに用いられ得る。別の治療法、例えば、抗IL17療法、T細胞共刺激モジュレーター（例えばOrencia（登録商標）-アバタセプト）：インターロイキン-6（IL-6）阻害剤（例えばActemra（登録商標）-トリシリズマブ）；抗CD20抗体（そのようなRituxan（登録商標）-リツキスマブ；またはB細胞活性化因子（例えば抗BAFF）等、を行うことがより適切であるかもしれない。他の代替療法には、janusキナーゼ（JAK）の阻害剤（例えばTofacitinib（登録商標）や脾臓チロシンキナーゼの阻害剤（Syk）（例えばFostamatinib（登録商標））が挙げられる。

【0033】

一実施形態において、本発明は、抗TNF療法が、関節リウマチを有する患者のための適切な治療であるかどうかを決定する方法を提供する。より具体的には、関節リウマチの患者の血漿または血清1ml中のテネイシンCのレベルが少なくとも31ng、または少なくとも33ngである場合には、その患者は抗TNF療法に応答する可能性は低い。

【0034】

好ましくは、本発明の方法はインビトロで実施される。

【0035】

患者は、哺乳類、好ましくはヒトであるが、サル（monkey）、類人猿（ape）、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ウサギまたは齧歯類であってもよい。

【0036】

さらなる態様によれば、本発明は、関節リウマチ患者のびらん性関節リウマチの状態を決定する方法であって：

(a) 該患者由来のサンプル中のテネイシンCのレベルの決定すること；および
(b) ステップ(a)で決定したテネイシンCのレベルを1以上の参照値と比較することを含んでなる方法を提供する。

【0037】

好ましくは、サンプルは血清サンプルまたは血漿サンプルである。好ましくは、サンプル中のテネイシンCのレベルは、サンプル1ml当たり、少なくとも31ng、または少

10

20

30

40

50

なくとも 33 ng である。好ましくは、参照値は、関節リウマチを有さない患者からの血漿または血清サンプル中のテネイシン C の値である。当業者であれば、上記で言及した全ての好ましい特徴はまた、本発明のこの態様およびすべての態様に適用することができるこことを理解する。

【0038】

本発明の別の態様によれば、患者によって提供されたサンプル中のテネイシン C のレベルを決定するための少なくとも 1 つの薬剤を含む、患者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。

【0039】

好ましい実施形態では、本キットは、患者の関節リウマチの状態、特にびらん性関節リウマチ状態の決定において使用するためのものであり、患者によって提供されるサンプル中のテネイシン C のレベルを決定するための少なくとも 1 つの薬剤を含む。 10

【0040】

本薬剤は、抗体であってもよい。

【0041】

本キットは、ラベルまたは折り込みの形態で、適切な操作パラメータに関する説明書を含んでいてもよい。説明書は、サンプルの採取方法について消費者に知らせるものであつてもよい。

【0042】

本キットには、較正および比較のための標準として使用する 1 つ以上のテネイシン C のサンプルが含まれていてもよい。また、キットには、サンプル中に検出されたテネイシン C のレベルを校正サンプルと比較するための説明書またはチャートが含まれていてもよい。さらに、キットには、テネイシン C のどの程度のレベルが、関節リウマチの、特にびらん性関節リウマチの診断となるかを示した説明書が含まれていてもよい。 20

【0043】

さらに別の態様によれば、本発明は、個人における炎症性疾患の状態を評価する手段として、血液または血清サンプル中のテネイシン C のレベルの決定の使用を提供する。

【0044】

好ましい実施形態において、本発明は、個人における、関節リウマチの状態、特にびらん性関節リウマチの状態を評価する手段として、血液または血清サンプル中のテネイシン C のレベルの決定の使用を提供する。 30

【0045】

別の態様によれば、本発明は、患者からのサンプル中のテネイシン C のレベルの決定および炎症性治療、および特に、観察されたテネイシン C のレベルに基づく関節リウマチまたはびらん性関節リウマチの治療、の投与を含んでなる、リウマチ性関節炎や特にびらん性関節リウマチなどの、患者におけるにおける炎症状態を治療する方法を提供する。好ましくは、テネイシン C のレベルが、参照サンプル中のレベルよりも大きい場合、治療が投与される。参照サンプルは、炎症状態でない正常な患者からのサンプルであつてよい。テネイシン C のレベルが 31 ng / mL、好ましくは 33 ng / mL より高い場合に治療を投与することができる。テネイシン C のレベルが 31 ng / mL、および好ましくは 33 ng / mL よりも大きい場合には、抗 TNF 療法の代替療法が投与されてもよい。代替療法は、前述の治療法の 1 つであつてよい。 40

【0046】

さらなる態様によれば、本発明は、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチを治療する方法であつて、患者からのサンプル中のテネイシン C のレベルの決定、およびテネイシン C のレベルが参照サンプル中のレベルよりも高いが、33 ng / mL 未満、好ましくは 31 ng / mL 未満である場合、抗 TNF 療法を投与することを含む方法を提供する。

【0047】

さらなる態様によれば、本発明は、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチを治療する方法であつて、患者からのサンプル中のテネイシン C のレベルの決定、およびテネイシ 50

ンCのレベルが31ng/mLを超える、好ましくは33ng/mLを超える場合、抗TNF療法でない療法を投与することを含む方法を提供する。

【0048】

代替療法は、抗IL-17療法または前述の任意の代替療法であってよい。当業者は、本発明のいずれか1つの実施形態および/または態様の好ましい特徴が、本発明のその他すべての実施形態および/または態様に適用できることを理解するであろう。

【0049】

本発明を、以下の図面を参照しながら、単なる例示として、より詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0050】

10

【図1】関節リウマチの患者においてテネイシンCレベルが有意に増加していることを示す。この試験で52人の患者を調べ、関節リウマチを有する患者の86.6%が異常に高い（有意に増加した）テネイシンCレベルを示した。結果は、関節リウマチ患者についてのテネイシンCの平均値が87.87ng/mL血清であり、正常な集団ではテネイシンCの平均値が20.34ng/mL血清であることを示している。関節リウマチ患者の95%信頼限界は31ng/mLであり、即ち、31ng/mL血清より高いテネイシンCレベルは関節リウマチと診断される。

【0051】

【図2】関節リウマチ（RA）の患者におけるテネイシンCの循環レベルを示すウエスタンプロットである。図2Aは、RA患者からのベースラインサンプルでは320kDaの1本の顕著なTNCバンドが認められた（n=18）ことを示している。ELISAによって検出された、同サンプルの対応するTNCレベル（pg/ml）をプロットの下に示す。TNCの低いレベルは、対照の健康な血漿（N）で検出された。rhTNC=0.05μgヒト組換えTNC。図2Bは、抗テネイシンC抗体を用いてウエスタンプロッティングを行ったとき、何人かのRA患者（TNC）の血漿中に、320kDaで検出された主バンドに加え、分子量219、201、190および156kDaのバンドが存在していたことを示している。同メンブレンのポンソーソ染色は、各RAサンプルについて等価なタンパク質負荷を示している。

20

【0052】

【図3】関節炎に関して、テネイシンCレベルと現在使用されているCRPおよび抗CCPマーカーとの間に相関関係はないことを示している。即ち、テネイシンCは、特に関節リウマチ、および具体的にはびらん性関節リウマチに関しては、代わりとなる改善されたバイオマーカーであることを示している。この試験では52人の患者を調べ、テネイシンCの血清レベルを、CRPおよび抗CCPの血清レベルと比較した。TNCのレベルは、CRPまたは抗CCPのいずれとも関係性がなく、テネイシンCは関節リウマチの特有のバイオマーカーであることを示している。

30

【0053】

【図4】関節リウマチ患者の血清におけるテネイシンC発現レベルと、患者の関節において観察されたびらん（erosion）の程度との相関関係を示す-X軸は観察された骨びらんの数を表す。示したデータは、血清中のテネイシンCのレベルは、関節における骨びらんの存在を示すものであり、テネイシンCのレベルが高いほどより多くのびらんが観察される。

40

【0054】

【図5】関節リウマチ患者を、血清中のテネイシンCのレベルが異常な群（即ち、31ng/mLより高い）とテネイシンCのレベルが正常な群（即ち、血清中のテネイシンCレベルが0~31ng/mL）とに分けた場合、テネイシンCレベルが異常な患者は、びらんスコアが統計的に増加していることを示している。即ち、血清中のテネイシンCレベルはびらん性関節リウマチに関する優れたバイオマーカーであることを示している。

【0055】

【図6】図6A~6Cは、テネイシンCレベルと、圧痛関節数（TJC）および腫脹関節

50

数 (SJC) (GPにより計数)との間 (図6A)、または総合評価スコア (医師の総合評価。患者の疾患活動性をどのように評価したか 1 ~ 10 のスコアで評価) (図6B)、またはバイオマーカー CRP または赤血球沈降速度 (ESR) との間 (図6C) に相関はないことを示している。CRPは、炎症において上昇する急性期タンパク質であり、炎症の非特異的なメーカーであり、そのレベルはELISAによって測定される。ESRは、赤血球が1時間に沈降する速度であり、炎症の非特異的な尺度である。試験を行うには、ウェスタークレン管として知られる直立した試験管に抗凝固処理した血液を入れて、赤血球が沈降する速度を測定し、mm / 時間として表する。ESRは、沈降が亢進する因子 (pro-sedimentation factors) (主としてフィブリノゲン) と、沈降に抵抗する因子、即ち赤血球の負電荷 (ゼータ電位)とのバランスによって支配される。炎症プロセスが存在する場合、血液中のフィブリノゲンレベルが高くなることで赤血球細胞が互いに引き寄せられる。

【0056】

【図7】7人の関節リウマチ患者における、テネイシンCレベルに対する抗TNF療法 (インフリキシマブ (登録商標) およびメトトレキサート (MTX)) の効果を示す。結果は、これらの治療法は、テネイシンCに対する効果が非常に短い期間であることを示している。

【0057】

【図8】ヒトテネイシンCのアミノ酸配列を示す。

【0058】

【図9】ベースラインのテネイシンCレベルから、インフリキシマブ (抗TNF) 療法開始後 16 - 18 週および 54 週での、RA患者における今後の圧痛関節数が予測されることを示す。ベースライン (治験に入る) でのコホートAのRA患者由来の血清を、ELISAによりテネイシンCレベルについて分析した。テネイシンCレベルを、インフリキシマブ療法後 16 - 18 週目 (A) および 54 週 (B) にこれらの患者において施術者により測定された圧痛関節数とともに示す。有意度をスピアマンの順位相関分析により決定した。コホートAにはACR1987判断基準に従ってびらん性RAの診断を受け、症状が 0.5 ~ 3 年続いている患者を含む。コホートBは、疾患活動性が中程度かそれ以上のRAと診断された患者を含む。

【実施例】

【0059】

正常 / 対照被験者と比較した、関節リウマチ患者におけるテネイシンCレベルの評価

血清を、関節リウマチを有する患者および正常な被験者の血液から得、使用するまで -80 で保存した。分析の日に血清を氷上で解凍し、ELISAで使用するため、典型的に EIA 緩衝液 (PBS中、1% BSA、0.05% Tween20) で 1 : 50 に希釈した。ELISAキットは、IBL (カタログ番号27751) から購入し、ヒトテネイシンCの高分子量バリアントを検出するために使用した。希釈した血清 100 μL を、非標識の捕捉抗テネイシンC抗体で予めコーティングした ELISA プレートにて 60 分間 37 で 2 回インキュベートした。プレートを 7 回洗浄し (0.001% Tween20/PBS中)、HRP - 標識抗ヒトテネイシンC抗体 (100 μL) を各ウェルに加えた。次いで、ウェルを 4 で 30 分インキュベートした後、0.001% の Tween20/PBS で 9 回洗浄した。次いで、色素 100 μL (TMB 液) を各ウェルに加え、暗所で 30 分間または色の変化が十分であると判断されるまでインキュベートした。反応は 100 μL の 1N H₂SO₄ の添加によって停止させた。色の変化を、マルチスキャンプレートアナライザーを使用して 450 nm で読み取り、テネイシンCの濃度を、Ascent version 2.6 を用いて計算した。標準として ELISA プレートから得られたテネイシンC (24 ~ 0.38 ng / mL) から作成した標準曲線を使用した。

【0060】

上記の ELISA を、関節リウマチ患者 52 人、および関節リウマチの兆候を示さなかった正常対照被験者 20 人から得た血清サンプルについて行った。結果を図1に示す。慢性関節リウマチ患者においてテネイシンCの有意に高いレベルが示され、31 ng / mL、ま

10

20

30

40

50

たは 3 3 ng / mL より高い血清中レベルのテネイシン C で、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチ、の診断が可能であることを示している。

【 0 0 6 1 】

ウェスタンプロット法では、慢性関節リウマチ患者のサンプル中に存在するテネイシン C の主要な形態は分子量 3 2 0 kDa である（図 2 A）が、何人かの患者ではマイナーな小さい分子量の形態のテネイシン C も観察された（図 2 B）ことが分かった。

【 0 0 6 2 】

図 2 のウェスタンプロットデータは、以下の方法を用いて得た。血清または血漿 1 μL を 4 ~ 12 % ビス - トリスプレキャストポリアクリルアミドゲル（Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK）上で電気泳動した。タンパク質をニトロセルロースメンブレン（Amersham, GE Healthcare, Chalfont, UK）上に移し、ポンソーアルカリイオニツ染色（Sigma Aldrich, Gillingham, UK）を用いて可視化した。TBS/0.01% Tween で洗浄して汚れを除去した後、メンブレンを、室温で 1 時間、5% BSA/TBS-Tween 中でブロックし、1 : 1 0 0 0 希釈のヒト TNF の N 末端領域を認識する一次抗体（MAB 1908, Merck Millipore, Watford UK）と共に 1 : 1 0 0 0 希釈で 37 °C で 1 時間インキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウス IgG（Dako, Ely, UK）を、1 : 3 0 0 0 希釈にて二次抗体として使用した。結合した抗体を、増強化学発光キット（Amersham, GE Healthcare）を用いて検出し、Super RX 医療用 X 線フィルム（フジ、日本）上に可視化した。

【 0 0 6 3 】

関節リウマチ患者におけるテネイシン C レベルと骨びらんとの間の相関関係

患者の血清中のテネイシン C のレベルとびらん性関節リウマチとの間の相関を実証するために、慢性関節リウマチ患者におけるびらんのレベルを、血清中の循環テネイシン C レベルと比較した。

【 0 0 6 4 】

Rheumatology (Oxford). 2005 Jun;44(6):721-8. Epub 2005 Jan 11. Review. において Taylor PC によって記載されるように、びらんを超音波およびパワードプラ画像法を用いて測定した。

【 0 0 6 5 】

図 4 に示すように、びらんスコアをテネイシン C レベルに対してプロットしたとき、有意な相関関係が観察される。

【 0 0 6 6 】

図 5 はさらに、血清におけるテネイシン C の異常なレベル（即ち、3 1 ng / mL より高い）を有する関節リウマチ患者のびらんスコアを、テネイシン C の正常なレベル（血清中のテネイシン C レベルが 0 ~ 3 1 ng / mL である）を有する関節リウマチ患者と比較することによって、びらん性関節リウマチとのさらに強い相関関係が実証されている。異常なテネイシン C レベルを有する患者は、統計的にびらんスコアが増大することが示された。したがって、血清中のテネイシン C 濃度は、びらん性関節リウマチの優れたバイオマーカーであることを示している。

【 0 0 6 7 】

さらに、関節リウマチのその他の測定結果とテネイシン C のレベルとの間に有意な相関関係は観察されず（図 6 A ~ 6 C）、血清中のテネイシン C が、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチの優れたバイオマーカーであることをさらに示している。

【 0 0 6 8 】

テネイシン C レベルに対する関節リウマチ治療の効果

図 7 に示すように、関節リウマチのための現在用いられている治療法は、テネイシン C レベルになんらかの影響を及ぼすようにはみられない。

【 0 0 6 9 】

高レベルの血清テネイシン C は、インフリキシマブ治療を受けた患者における関節の圧痛を予測する

インフリキシマブ等の抗 TNF 薬での治療によってもたらされた大きな進歩にもかかわ

10

20

30

40

50

らず、相当の割合の関節リウマチ患者は抗TNF剤で治療を受けても応答せず、関節の崩壊とDAS28スコアの増大が継続する。びらんスコアを有するテネイシンCレベルと、循環テネイシンCレベルに対するインフリキシマブの効果との間の相関関係を踏まえ、テネイシンCのレベルが、インフリキシマブ処置した患者における将来の疾患進行の予測因子として役立つかどうかを判断するため実験を行った。テネイシンCのベースラインレベルまたは治療開始後18または52週でのテネイシンCレベルの変化と、インフリキシマブに対する応答の間には関係性がなかった。しかし、ベースラインでのテネイシンCのレベルと治療開始後16～18及び54週目の両方でのインフリキシマブ処置した患者におけるその後のTJCスコアとの間には有意の相関関係がみとめられた（図9）。したがって、これらのデータは、インフリキシマブ治療の開始前にテネイシンCのレベルが高い患者は、インフリキシマブ療法にもかかわらず、解決されない関節の圧痛を伴う可能性がより高いということを示唆している。10

【0070】

結果は、1年先立つことに限りにおいて、抗TNF治療開始前の血清中のテネイシンCのレベルは、患者における圧痛関節数の予測因子として役立ち、抗TNF治療から恩恵を受ける可能性がある患者と、応答する可能性がない患者とを区別することが可能であることを示している。

【0071】

さらに、図2に示された結果は、関節リウマチ、特にびらん性関節リウマチ患者の血清中のテネイシンCの主なバリエントは、「大きなアイソフォーム」プロセシングを構成する分子量320kDaのアイソフォームである。テネイシンCは、大きな、マルチモジュラー分子である。これは、アッセンブリードメイン、一連の14半の上皮細胞成長因子様リピート、最大17のフィブロネクチンIII型様リピート(TNIII)、およびフィブリノーゲン様グローブを含む、数多くの個別のドメインを含んでなる。テネイシンCは、択一的にスプライシングされて190から320kDaのサイズの範囲の単量体を生じる単一の遺伝子によってコードされる。これは具体的にはTNIIIドメインで生じる。その8個は、構成的に発現し(TNIII-8)、その9個は、択一的にスプライシングされ得る(A1-4、B、AD2、AD1、CおよびD)。20

【図1】

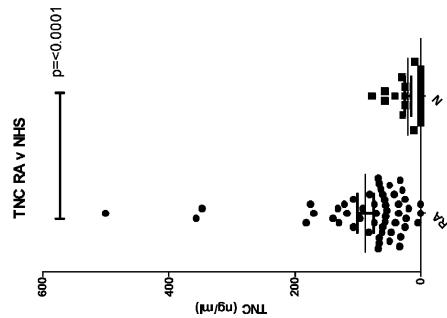


FIGURE 1

【図2】

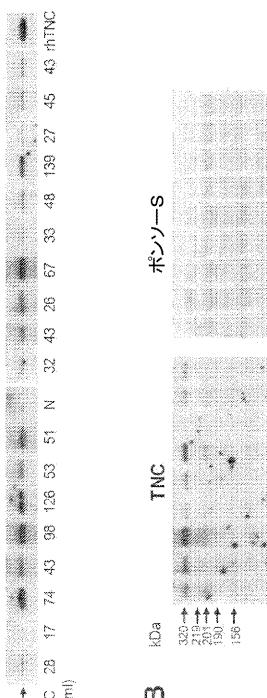


FIGURE 2

【図3】

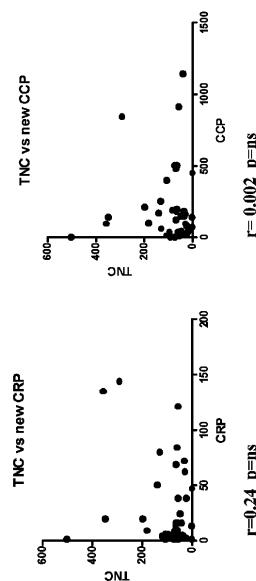


FIGURE 3

【図4】

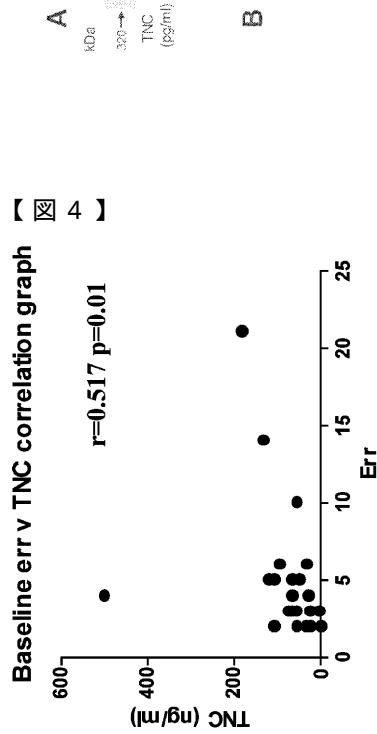


FIGURE 4

【図5】

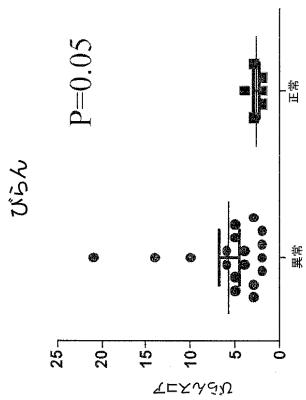


FIGURE 5

【図6 A】

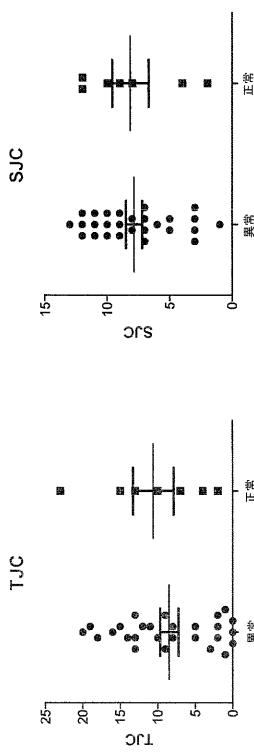


FIGURE 6A

【図6 B】

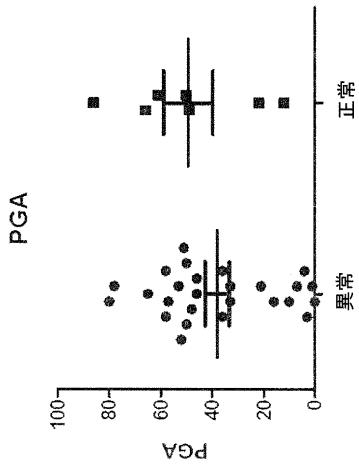


FIGURE 6B

【図6 C】

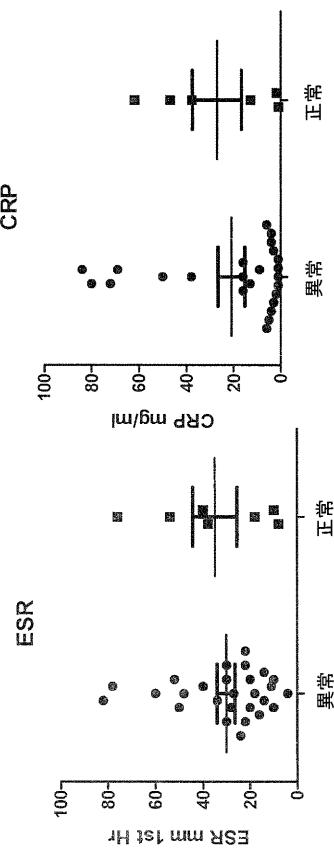


FIGURE 6C

【図7】

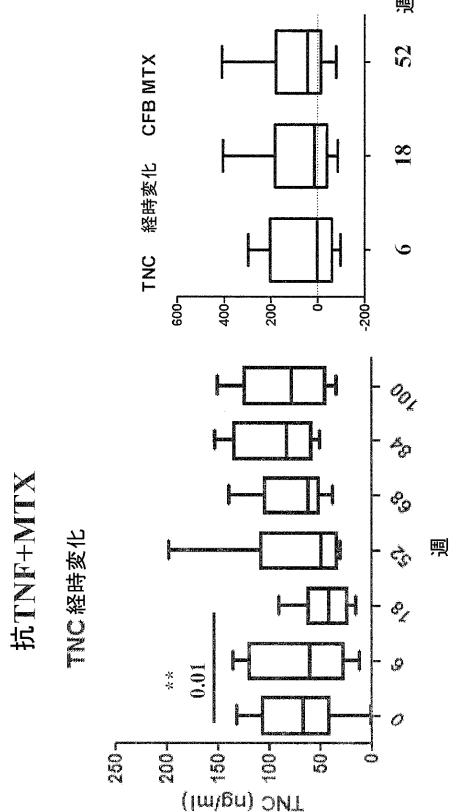


FIGURE 7

【図8-1】

10 20 30 40 50 60
MGAMTQLLAG VELAFLALAT EGGVLKRVK HHRQSGVNAT LPEENQPVVF NHVYNIKLKV
70 80 90 100 110 120
GSQCSVLDLS ASCENKDLAPP SEPSESPQEH TVDGENQIVP THRINIPRRA CGCAAAPDVK
130 140 150 160 170 180
ELLSRLSELE NLVSSLRQC TAGAGCCLQF ATGKLDTRPF CGSRGNFSTE CGGCVCCEPGW
190 200 210 220 230 240
KGPNCSSEPEC PGNCILHRGC IDGQCCICDDG FTGEDCQLA CPSDCNDQKG CVNGVCIICFZ
250 260 270 280 290 300
GYAGADCSRE ICPVPCSEH GTCVBDGLCVC HDGPGAGDDCN KPLCINNCYH RGRCVNEVCV
310 320 330 340 350 360
CDEGFTGQEDC SELICPNDCF DRGRCLINGT YCEEGFTGQED CGKFTCPHAC HTQGRCEERQ
370 380 390 400 410 420
CVCDEGFGAV DCSEKRCPAD CHNRSGRCVGD RCECDDGFTG ABCGELKCPN GCSGIGRCV
430 440 450 460 470 480
GQCVCDGEGT GEDCSQRLRCP NDCHSBRGRVC EGKCVCEQGF KGYDCSDMSC PNDCHQHGR
490 500 510 520 530 540
VNGMCVDDG YTGEDCDRQ CPERDCSNRGL CVBDQCVCEG GFTGFTCABL SCPNDCHQGQ
550 560 570 580 590 600
RCVNGQCVCH EGFMGKDCKE QRCPDQDCHQ GRCVBDQGQIC HEGFTGLDCC QHSCPBDCCN
610 620 630 640 650 660
LGQCVSORCI CNEGYSRDC SEVSPPKDVL VTEVTEETVN LAWDNEMRVT EYLVVTTPH
670 680 690 700 710 720
EGGLEMQFNV PGDQTSIIQ ELEPGVYIY RVFAILENKK SIPVSARVAT YLBAPZGLKF

Figure 8...

【図8-2】

730 740 750 760 770 780
KSTIKETSVEV ENDPDLIAFF TWEIIIFRNMM KEDEGEITKS LRRPETSYRQ TGLAPGQYE
790 800 810 820 830 840
ISLHIVKNNT RGPGLKRVTY TRLDAPSQIE VKDQVDTTAL ITWFKPLARI DGEIETYGK
850 860 870 880 890 900
DVPGDRTTID LTEDENQYSI GNLKPDTIEYE VSLISRRGDM SSNPAKETFT TGDLAPRNL
910 920 930 940 950 960
RVSQTONSIT LEWNRNGKAAT DSYRKYAPI SGGDRAEVDV PKSQGATTKT TLTGTRPGTE
970 980 990 1000 1010 1020
YGIIVSAVKE DKESNPAINT AATELDTPKD LQVSETAETS LTLKLNKTPLA KFDTRYRLNYS
1030 1040 1050 1060 1070 1080
LPTQWVQCVQ LPRNNTTSYVU RGLEPGQEYN VLTAEKGRH KSKPARVKAS TEQAPELENL
1090 1100 1110 1120 1130 1140
TVTEVGDGL RLNTWAAQDA YEHFIQVQE ANKVAEARNL TVPGSLRAVD IPGLKATTPY
1150 1160 1170 1180 1190 1200
TVSIYCVIQC YRTFVPLSAEA STGETPNLGE VVAEVGNDA LKLNNTAPEG AYEYFFIQVQ
1210 1220 1230 1240 1250 1260
EADTVAAQN LTVPGGLRST DLPGGLKAATH YITITRGVQ DFSTTPLSVE VLTEBVPDMG
1270 1280 1290 1300 1310 1320
NLTVTEVSNL ALRLNWTTED QTYDQFTIQV QEADQVEEAH NLTVPGSLRS MEIPGLRAGT
1330 1340 1350 1360 1370 1380
PYTVLHGEV RGHSTRPLAV EYVTEDLPLQL GDLAVSEVGVW DGLRLNWTAAN DNAYEHFVQ
1390 1400 1410 1420 1430 1440
VQEYVKEAQN QNLTLPLGSLR AVDIPGLEAV TPYRVSIYGV INGYRTPVLS AESTAKKEPE

Figure 8...continued

【図8-3】

1450 1460 1470 1480 1490 1500
IGNLNVSDIT PESFNLSWMA TDGIFETFTI EIIDSNLLE TVZYNISGAE RTAHISGLP
1510 1520 1530 1540 1550 1560
STDPIVVKLNT LAPSIRTKTI SATAMTEALP LLLENLTISDI NPYCFTVSWM ASENAFDSFL
1570 1580 1590 1600 1610 1620
VTVVDGSKLL DPQSTTLSGT QRKLLERLGLI TGIGYEVMS GFTQGHQCKP LRAELIVTRAE
1630 1640 1650 1660 1670 1680
PEVDNLLVSD ATPPDFPLSLW TADEGFDNFN VLKIRDITKKQ SEPLEZTLLA FERTDITGQ
1690 1700 1710 1720 1730 1740
REATEYIEEL YGISKGRRSQ TVSAIATVAM GSPKEVIFSD ITENSATVSW RAPTAQVSEF
1750 1760 1770 1780 1790 1800
RITYVPTGG TPSMVTVDOT KTQTRDVLKII PGVEYLVSIAM AMKGFESEF VSGSFTTALD
1810 1820 1830 1840 1850 1860
GPSGLVYANI TDSEBLARWQ PALATVSYV 1SYTGEKVPZ ITKRVSGNTV EYALTOLEPA
1870 1880 1890 1900 1910 1920
TEYTLRIFAE KGPQKSSTIT AKFTTDLSDP RDLTATEVQZ ETALLTWRPF RASVYGYLLV
1930 1940 1950 1960 1970 1980
YESVDTGTVKE VIVGPDTSY SLADLSPSYH YTAKIQALNG PLRSNMIQTI FTTIGSLLYPF
1990 2000 2010 2020 2030 2040
PKDCS9QALMN GDTTSGLYTI YLNGCDKAEL EVFCIMTSDG GGWIVFLRRK NGRENFYQNW
2050 2060 2070 2080 2090 2100
KAYAAGFGDR REEPWLGDN LNKITAQGQY ELRVLDLHDG STAPAVYDKF SVGDAKTRYK
2110 2120 2130 2140 2150 2160
LKVEGYSGTA GDSMAYHNGR SFSTFDKDT SAITNCALSY KGAFWYRNCH RVNLNGRYGD

Figure 8...continued

【図8-4】

2170 2180 2190 2200
NNHSQGVNWF HNKGEHSIQ FAEMKLRFPSN FRNLEGRRKR A

Figure 8...continued.

【図9】

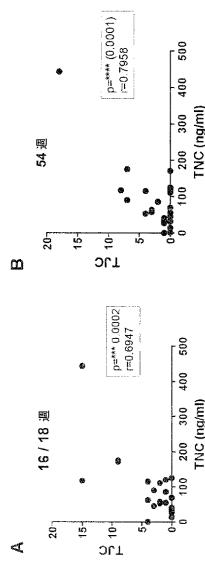


FIGURE 9

【配列表】

0006158825000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
	C 0 7 K 14/47 Z N A

(72)発明者 キム・スザンヌ・ミッドウッド
 英国ダブリュー6・8エルエイチ、ロンドン、アスペンリー・ロード65番、ユニバーシティ・オブ・オックスフォード、ザ・ケネディ・インスティテュート・オブ・ルーマトロジー内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開2004-138489 (JP, A)
 国際公開第2010/103289 (WO, A1)
 特表2011-516876 (JP, A)
 米国特許出願公開第2006/0105378 (US, A1)
 MIDWOOD KIM, NATURE MEDICINE, 米国, NATURE PUBLISHING GROUP, 2009年 7月 1日, V15 N7, P774-780
 MASAHIRO HASEGAWA, JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH, 2007年 5月 1日, V25 N5, P563-568
 SCHENK SUSANNE, TENASCIN-C IN SERUM: A QUESTIONABLE TUMOR MARKER, INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, 米国, JOHN WILEY & SONS, INC., 1995年 1月 1日, V61 N4, P443-449
 S. M. Ling, Serum protein signatures detect early radiographic osteoarthritis, Osteoarthritis and Cartilage, 2009年, Vol.17 No.1, Page.43-48
 L. Patel, TENASCIN-C LARGE, AN ELASTIC PROTEIN INDICATING JOINT DISEASE/INJURY IN HUMANS & PRECLINICAL ANIMAL MODELS, Osteoarthritis and Cartilage, 2009年, Vol.17, Supplement 1, Page.S68-69 114
 L. Patel, INDUCTION OF INFLAMMATORY MEDIATORS AND MATRIX DEGRADATION IN ARTICULAR CARTILAGE BY TENASCIN-C AND TLR4 SIGNALING, Osteoarthritis and Cartilage, 2010年, Vol.18 Supplement 2, Page.S35 062
 P.S. Chokalingam, TENASCIN-C LEVELS IN SYNOVIAL FLUID ARE ELEVATED AFTER HUMAN JOINT INJURY AND CORRELATE WITH MARKERS OF MATRIX DEGRADATION AND INFLAMMATION, Osteoarthritis and Cartilage, 2011年, Vol.19, Supplement 1, Page.S19 28
 Vingsvo-Lundberg C, Increased serum level of cartilage oligomeric matrix protein in chronic erosive arthritis in rats, Arthritis and rheumatism, 1998年, Vol.41 No.3, Page.544-550
 Ruhmann, M. , A role for tenascin-c in driving Th17 cell polarization in the RA joint? , Immunology, 2011年, Vol.135 Suppl.1, Page.148 234
 Piccini A.M. , Persistent expression of the pro-inflammatory extracellular matrix glycoprotein tenascin-C drives arthritic joint disease , International Journal of Experimental Pathology, 2011年, Vol.92 No.3, Page.A30 A52
 窪田泰浩, トシリズマブを使用して臨床的寛解にいたった関節リウマチ3例のMR所見, 臨床リウマチ, 2011年, Vol.23 No.3, Page.194-200

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N	3 3 / 6 8
A 6 1 K	4 5 / 0 0
A 6 1 P	1 9 / 0 2
A 6 1 P	2 9 / 0 0

G 01 N 33 / 53
A 61 K 39 / 395
C 07 K 14 / 47
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)