

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6154748号
(P6154748)

(45) 発行日 平成29年6月28日 (2017.6.28)

(24) 登録日 平成29年6月9日 (2017.6.9)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564 B
CO 7 K 14/75 (2006.01)	GO 1 N 33/53 X
	CO 7 K 14/75 Z N A

請求項の数 20 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2013-552484 (P2013-552484)	(73) 特許権者	511181533
(86) (22) 出願日	平成24年2月1日 (2012.2.1)		アカデミス ズィーケンハイス レイデン
(65) 公表番号	特表2014-505884 (P2014-505884A)		ハー. オー. デー. エン. エルユーエ
(43) 公表日	平成26年3月6日 (2014.3.6)		ムセー
(86) 国際出願番号	PCT/NL2012/050056		オランダ国 2333 ゼットアー レイ
(87) 国際公開番号	W02012/105838		デン アルビヌスドレーフ 2
(87) 国際公開日	平成24年8月9日 (2012.8.9)	(74) 代理人	110000442
審査請求日	平成26年12月16日 (2014.12.16)		特許業務法人 武和国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	11153046.5	(72) 発明者	トラウ, レーデルト アドリアヌス
(32) 優先日	平成23年2月2日 (2011.2.2)		オランダ国 2333 ゼットアー レイ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		デン アルビヌスドレーフ 2内
(31) 優先権主張番号	11182399.3	(72) 発明者	トゥース, レイナルドゥス エフェラルド
(32) 優先日	平成23年9月22日 (2011.9.22)		ゥス マリア
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		オランダ国 2333 ゼットアー レイ
			デン アルビヌスドレーフ 2内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗カルバミル化タンパク質抗体及び関節炎リスク

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ある形態の関節炎に罹患した、または、罹患するリスクのある、個体を分類するのを補助する方法であって、

前記方法は、

前記個体の体液を含む試料が抗カルバミル化タンパク質（抗CarP）抗体を含むかどうかを判定することを含み、

前記方法は、

前記試料を（a）カルバミル化ウシ胎仔血清（Ca-FCS）、または、（b）カルバミル化フィブリノーゲン（Ca-Fib）、または、それから誘導されるペプチドと接触することを含むことを特徴とする、方法。

【請求項2】

関節炎の発症の予後を前記関節炎に罹患した個体に提供するのを補助する方法であって、

前記方法は、

（a）カルバミル化ウシ胎仔血清（Ca-FCS）、または、（b）カルバミル化フィブリノーゲン、または、それから誘導されたペプチドと接触させることにより、前記個体の体液を含む試料が抗カルバミル化タンパク質（抗CarP）抗体を含むかどうかを判定することを含むことを特徴とする、方法。

【請求項3】

ある形態の関節炎に罹患した、または、罹患するリスクのある、個体を分類するのを補助する方法であって、

前記方法は、

前記個体の体液を含む試料が抗 C a r P 抗体を含むかどうかを判定することを含み、

前記試料は、

抗シトルリン化タンパク質抗体 (A C P A) に対して陰性であることを特徴とする、方法。

【請求項 4】

前記試料を、C a - F C S と接触させることを含むことを特徴とする、請求項 1 から請求項 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記試料を、C a - F i b、または、それから誘導されるペプチドと接触させることを含むことを特徴とする、請求項 1 から請求項 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記体液は、血清試料、または、滑液試料であることを特徴とする、請求項 1 から請求項 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗 C a r P 抗体は、I g サブタイプ I g A または I g サブタイプ I g G であることを特徴とする、請求項 1 から請求項 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記個体が関節炎に罹患するリスクがあるかどうかを判定するのを補助することを特徴とする、請求項 1、請求項 3 から請求項 7 のいずれか一項に記載の方法であって、

20

前記体液試料が得られた時点で前記個体が関節炎に罹患していないことを特徴とする、方法。

【請求項 9】

前記関節炎は、

リウマチ様関節炎、若年性関節炎、乾せん性関節炎、骨関節炎、リウマチ性多発筋痛、強直性脊椎炎、反応性関節炎、痛風、偽痛風、自己免疫性関節炎、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、線維筋痛、ライム病、未分化関節炎、非リウマチ性関節炎、または、脊椎関節症を含むことを特徴とする、請求項 1 から請求項 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記関節炎は、リウマチ様関節炎、若年性関節炎、または、未分化関節炎であることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

さらに、前記個体の関節炎分類指標として更なる因子を決定することを含む、請求項 1 から請求項 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記更なる因子は、A C P A、リウマチ因子、C 反応性タンパク質、および / または、赤血球沈降速度からなることを特徴とする、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

関節炎のマーカーとしての個体の体液中の抗 C a r P 抗体の検出キットであって、(a) カルバミル化ウシ胎仔血清 (C a - F C S)、または、(b) カルバミル化フィブリノーゲン (C a - F i b)、または、それから誘導されるペプチドを含むことを特徴とする、キット。

40

【請求項 14】

カルバミル化ウシ胎仔血清 (C a - F C S) を含むことを特徴とする、請求項 13 に記載のキット。

【請求項 15】

カルバミル化フィブリノーゲン (C a - F i b)、または、それから誘導されるペプチドを含むことを特徴とする、請求項 13 に記載のキット。

50

【請求項 16】

前記カルバミル化フィブリノーゲン (Ca - Fib)、または、それから誘導されるペプチドは、表 1、表 2、表 3 に示されたペプチドから選択されることを特徴とする請求項 15 に記載のキット。

【請求項 17】

前記カルバミル化ウシ胎仔血清 (Ca - FCS)、または、前記カルバミル化フィブリノーゲン (Ca - Fib) は、インビトロにおいてカルバミル化されることを特徴とする、請求項 13 から請求項 16 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 18】

抗ヒト免疫グロブリン抗体を更に含むことを特徴とする、請求項 13 から請求項 17 のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項 19】

前記抗ヒト免疫グロブリン抗体は、抗ヒト IgG、または、抗ヒト IgA、または、これらの組み合わせを含むことを特徴とする、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

シトルリン化タンパク質、または、ペプチドを含むことを特徴とする、請求項 13 から請求項 19 のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、翻訳後修飾及び関節炎の分野に関する。本発明は、特に、個体の体液を含む試料における翻訳後修飾タンパク質若しくはペプチド又は翻訳後修飾タンパク質若しくはペプチドに特異的な抗体の検出に基づいて個体の試料を分類する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

関節炎には 100 を超える異なる形態がある。最も一般的な形態は骨関節炎 (変形性関節症) である。骨関節炎は、最も一般的には、関節の外傷又は感染の結果であるが、容易に確認できない原因もある。後者は、加齢性骨関節炎と総称されることが多い。別の関節炎形態は、例えば、リウマチ様関節炎、乾せん性関節炎、及び関連した自己免疫疾患である。

30

【0003】

関節炎患者の主要な愁訴は関節痛である。とう痛は、定常性であることが多く、患部関節に限局することがある。関節炎のとう痛は、関節に引き起こされた損傷の結果、又は関節周囲に生じた炎症の結果であることが多い。別の愁訴は、堅く痛い関節に対する強引な動き及び疲労に起因する筋挫傷の結果としてのとう痛である。

【0004】

関節関連とう痛患者の診断は、愁訴が一般に明確でなく、一部は関節炎ではない種々の原因に帰し得るので、容易ではない。実際、初めて来院した関節痛関連の愁訴を有する多数の患者は寛解して、慢性関節炎を発症せず、かなり少数しかリウマチ様関節炎 (RA) を発症しない。自然に寛解する個体が治療を受ける必要はないが、発症する個体が早期治療によりかなりの恩恵を得ることは明らかである。それぞれの群を識別するために、現場は、関節炎の診断をより確実に行うことができる一連の試験を開発した。かかる試験は、現在、関節炎を示すものがその中に存在しないかどうか組織試料及び/又は体液試料をスクリーニングする必要がある。かかる指標は、とりわけ、例えば、ある種のケモカイン、サイトカイン、他の免疫細胞シグナル伝達因子などの「慢性」炎症指標の測定、関節における活性免疫細胞「の蓄積」の測定、及び/又は血中のある種の因子、最も注目すべきはリウマチ因子の存在である。最近、シトルリン化タンパク質若しくはペプチド又はかかるシトルリン化タンパク質若しくはペプチドに特異的な抗体の検出を対象とした試験が、かかる試験の有用なツールとして開発された。かかる試験を利用できることによって、ある形態の関節炎を有する疑いのある個体の診断が大幅に改善された。これらの試験は、今後

40

50

の発症についてより正確な予後を関節炎に罹患した個体に与えるのに臨床医の助けにもなっている。しかし、これらの開発にもかかわらず、関節炎又はそのリスクのある個体の診断にはまだ多くの要望がある。

【 0 0 0 5 】

例えば、オランダにおいては、RA診断の推奨は、ACR/EULAR 2010基準によって作成された確率スコアに基づく。この基準は、関節のタイプ及び数の関与、血清学的因子リウマチ因子及び抗CCP抗体の有無、CRPなどの急性期タンパク質の有無、愁訴期間などの臨床的特徴を組み合わせたものである。このプロトコルに従ってRAと診断された患者は、6を超えるポイントを有する必要がある。臨床的関与及び愁訴期間のみで陽性診断に十分であるということは、関節炎集団が極めて異質であることを示しており、
10 実際、誤診が多い。

【 0 0 0 6 】

オランダ及び他国においては、関節炎のタイプ分け又は関節炎発症リスクのある個体の診断の試験は、現在、かかる患者の体液試料中のシトルリン化タンパク質又はペプチドに特異的な抗体の検出試験を含む。これらの試験は、関節炎患者が、シトルリン化タンパク質に対する抗体(ACPA)の陽性に基づいて分類できるという見通しを与える。ACPAの同定は、RAの理解に重大な影響を及ぼした[1]。遺伝及び環境の危険因子[2]、進行[3]寛解[4]及び治療に対する応答[5]に関してACPA陽性RA患者とACPA陰性RA患者を比較すると、主要な相違が認められた。近年、ACPA陽性RAの出現率及び原因病理学に対するより多くの洞察が得られた。しかし、ACPA陰性RAに
20 対してははるかに少ない情報しか利用できない。ひとつには、これは、良好なアッセイが現在ないので、これらの個体を特定すること、又はサブグループ化することさえ、比較的困難だからである。興味深いことに、リツキシマブ治療は、RF及びACPAが陰性な患者にも有益であることが報告された[6、7]。

【 0 0 0 7 】

PAD酵素によるアルギニン残基からシトルリン残基への翻訳後修飾は、ACPA抗原を生成する必須ステップである[1]。生理環境下では、このシトルリン化は、毛及び皮膚のような組織において十分に結合していない組織層を生成するのに重要である[8]。核においても、シトルリン化は、後成的調節[9]、及び翻訳[8]と病原体に対する宿主防御[10]の両方に重要であるクロマチン凝縮においてある役割を果たす。細胞死が
30 どん食能を圧倒し得る病的状況下では、壊死性細胞死によってPADが細胞外空間に放出されることがあり、そのより高いカルシウム濃度のために別の宿主分子もシトルリン化される[8]。これらの分子の多くが免疫系に非自己として提示されるので、一部の個体においては抗体応答を誘発することがある。シトルリンは、ホモシトルリンと称する別の翻訳後修飾アミノ酸に極めて類似している(図1)[11]。ホモシトルリンは、わずか1炭素長い、構造が似ている[11]。ホモシトルリンは、体内に尿素と平衡状態で存在するシアナートによる攻撃を受けて、リジン残基から生成される。生理的条件下では、尿素濃度が低すぎて大規模なカルバミル化(リジンをホモシトルリンに変えるプロセス)が起こらないこともある。腎不全の状態では、尿素濃度が増加し、カルバミル化を容易に
40 検出することができる。しかし、大部分のカルバミル化は、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)が好中球から放出される炎症中に起こる[12]。この酵素は、尿素の平衡をシアナート側に大きくシフトさせ、カルバミル化を起りやすくする[13]。最近、ホモシトルリンを含むタンパク質がRA関節中に存在し、これが動物モデルにおいてT細胞誘発及び自己抗体形成に影響を及ぼし得ることが判明した[11、14]。極めて類似しているが、カルバミル化は、その構造上の相違とは別に、アルギニンではなくリジンが修飾されるので、シトルリン化とは異なる。したがって、ホモシトルリンは、定義上、タンパク質次いでシトルリン中で別の位置にある。本発明においては、カルバミル化タンパク質に対する自己抗体が関節炎時に存在することが判明し、本発明者らはかかる抗体の測定が早期関節炎及びRAの診断、予後及び管理に有用であると判断した。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、ある形態の関節炎に罹患した、又は罹患するリスクのある、個体を分類する方法であって、前記個体の体液を含む試料が抗カルバミル化タンパク質（抗CarP）抗体を含むかどうかを判定することを含む、方法を提供する。

【0009】

関節炎に罹患した個体は、抗CarP抗体に基づいて、より重篤な形態の関節炎を発症するリスクが低い又は高い個体に分類することができる。抗CarPに陽性である関節炎を有する個体は、関節炎を有する抗CarP陰性個体よりも、少なくとも任意の所与の期間内により重篤な形態の関節炎を発症する傾向がある。抗CarP陽性個体は、抗CarP陰性個体と比較して、より重篤な形態により急速に進行する傾向もある。前記方法は、したがって、好ましくは、ある形態の関節炎に罹患した個体を、より重篤又は慢性形態の関節炎に進行する平均よりも低い又は高いリスクの群に割り当てるのに使用される。好ましい一実施形態においては、個体は、受診時に未分化関節炎に罹患している。この実施形態の好ましい一態様においては、前記のより重篤又は慢性形態はRAである。この実施形態の別の好ましい一態様においては、前記のより重篤又は慢性形態は、若年性関節炎、好ましくは若年性特発性関節炎である。好ましい一実施形態においては、平均よりも低いリスクの前記群は、関節炎疾患の自然寛解の発生率が平均より高い群である。

10

【0010】

リスク集団は、健康な個体、未分化関節炎又は関節痛の患者、関節疾患を有する自己抗体陽性個体、自己抗体陽性個体、関節炎患者の家族であり得る。若年性特発性関節炎は、一過性及び自己限定性又は慢性であり得る、小児期に見られる関節炎のサブセットに使用される用語である。若年性特発性関節炎の小児は、リスク集団と見なされ、これらの患者の一部は、慢性形態の関節炎を発症し得る。

20

【0011】

本発明によれば、抗CarP抗体の検出は、未分化関節炎、関節痛及び別の関節疾患を呈する、及び/又は若年性関節炎を呈する個体に有用である。抗CarP抗体の有無は、後年のRA又は持続性関節炎の発症を予示する。この予知力は、ACP A陰性とACP A陽性対象の両方で認められる。

【0012】

前述の方法は、したがって、好ましくは、個体が後年のRA又は持続性関節炎の発症リスクがあるかどうかを予測するのに使用される。

30

【0013】

例えば、ヒトカルバミル化フィブリノーゲンを抗CarP抗体の標的として使用することができる。カルバミル化フィブリノーゲンは、IgGとIgAの両方の抗CarP抗体によって認識される。完全なフィブリノーゲン、又はカルバミル化フィブリノーゲンから誘導されるペプチドのいずれかを、抗CarP抗体を検出するアッセイにおいて標的として使用することができる。完全なタンパク質、又はフィブリノーゲンから誘導されるペプチドのいずれかを、アッセイに直接使用することができ、又はストレプトアビジン被覆表面に結合する付着ピオチン基を介して固定化することができ、又は抗CarP抗体を検出する任意の他の方法に使用することができる。好ましい一実施形態においては、抗CarP抗体がカルバミル化フィブリノーゲンに特異的に結合する能力がある本発明による方法が提供される。本明細書を通して、抗Ca-Fib抗体という略語は、カルバミル化フィブリノーゲンに特異的に結合する能力がある抗体を指すのに使用される。

40

【0014】

関節炎における疾患、例えば、進行性とう痛疾患又は進行性関節損傷の進行は、一定ではない。進行は、ある期間、速いことも遅いこともあり得る。本発明においてより低い又はより高い進行リスクに言及するときには、これは、典型的には、調査される個体群内の平均進行リスクと比較される。

【0015】

50

疾患の進行は、毎年確立される群レベルにあり、追跡データは、反復測定分析によって分析することができる。それでも、個体レベルでは、抗C a r P、好ましくは抗C a - F i b陽性は、今後の進行を予示する。現在、M R I、超音波及び他の技術を含めて幾つかの方法が、短期の疾患の進行を測定するのに利用可能である。

【0016】

試料が抗C a r P、好ましくは抗C a - F i b抗体を含むかどうか評価するために、抗体の存在試験が実施される。かかる試験は、それだけに限定されないが、1種類/又は数種類のカルバミル化タンパク質及び/又はペプチドを使用する、E L I S A及び/又はウエスタンブロットを含むことができる。必ずではないが、一般には、試料に対して得られた結果は基準と比較される。基準は、典型的には、1人又は数人の健康な個体（すなわち、関節炎に罹患していないと考えられ、関節炎を発症する差し迫ったリスクがないと考えられる個体）に対して実施される類似の、好ましくは同じ試験の結果である。試料の結果を基準の結果と直接比較することができ、又は基準を使用してしきい値を決定することができる。しきい値以下では、試料は、抗C a r P、好ましくは抗C a - F i b抗体に対して陰性と判断され、しきい値以上では陽性と判断される。

【0017】

本発明は、さらに、関節炎の発症の予後を前記関節炎に罹患した個体に提供する方法であって、前記個体の体液を含む試料が抗カルバミル化タンパク質（抗C a r P）抗体を含むかどうかを判定すること、及び前記試料中の前記抗C a r P抗体の検出に基づいて前記関節炎の今後の重症度を推定することを含む、方法を提供する。好ましい一実施形態においては、前記抗C a r P抗体は、カルバミル化フィブリノーゲンに特異的に結合する能力がある（抗C a - F i b抗体）。この推定は、典型的には、ある時間間隔を伴い、その間により重篤な形態又は進行が明白になる又はならない（上記参照）。

【0018】

上記分類のひとつの利点は、個体の群が、他の方法よりも各群内でより均一な遺伝子プロファイルを有することである。別の利点は、個体の群は（予防的）治療に対する応答がより均一であることである。早期の積極的な治療が有益であることが判明したので[18、19]、本発明は、関節炎に罹患した又は罹患するリスクがある個体の関節炎治療方法であって、前記個体の関節炎診断を含み、前記診断が、前記個体の体液を含む試料中の抗C a r P抗体、好ましくは抗C a - F i b抗体を測定する方法を含む、方法を提供する。好ましくは、前記試料は、抗C a r P抗体、好ましくは抗C a - F i b抗体を含むと判定された。前記抗C a r P又は抗C a - F i b陽性個体のより厳密な治療は、患者に有益である。治療は、典型的には、前記治療を受ける前に関節炎と診断された患者になされる治療処置である。本発明は、さらに、関節炎に罹患した個体を関節炎薬物療法及び/又は治療によって治療する方法であって、前記個体が、前記治療前に本発明の方法によって診断されたことを特徴とする、方法を提供する。好ましくは、前記個体は、前記関節炎薬物療法及び/又は治療を受ける前に、本発明の関節炎に罹患した個体を分類する方法によって前記関節炎に罹患したと診断された。本発明は、さらに、関節炎を発症するリスクのある個体の関節炎薬物療法及び/又は治療による予防的治療であって、前記個体が、前記関節炎薬物療法及び/又は治療を受ける前に、本発明の個体を分類する方法によって前記関節炎を発症するリスクがあると診断されたことを特徴とする、方法を提供する。治療、この場合には予防的治療は、近い将来、典型的には分類の1年以内に発症するリスクがあると分類された個体にも施すことができる。かかる予防的治療は、少なくとも疾患の発症を遅らせる、及び/又は疾患の重症度を軽減することができる。

【0019】

関節炎患者又は関節炎を発症するリスクのある個体を分類する方法は、典型的には、幾つかの異なる試験を含む。かかる試験を本発明の方法と組み合わせて、より正確な分類評価を得ることもできる。このために、本発明は、さらに、関節炎に罹患した個体、又は関節炎の疑い/リスクのある個体を更に分類する手段及び方法を提供する。好ましい一実施形態においては、本発明の方法を抗シトルリン化タンパク質抗体（A C P A）試験と組み

10

20

30

40

50

合わせる。

【0020】

ACPA試験は、かなりの間使用されてきた(とりわけ、ベンルージ(Venrooij)他(2002):抗シトルリン化タンパク質/ペプチド抗体並びに初期リウマチ様関節炎の診断及び予後におけるその役割(Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis):ザネザーランズジャーナルオブメディスン(The Netherlands Journal of Medicine)Vol 60:pp383-388及びクラレスコグ(Klareskog)L,ロネリド(Ronnellid)J,ランドバーグ(Lundberg)K),パデュコフ(Padyukov)L,アルフレッドソン(Alfredsson)L.リウマチ様関節炎におけるシトルリン化タンパク質に対する免疫(Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis).アニュアルレビューオブイミュノロジー(Annu Rev Immunol)2008;26:651-75に概説されている)。

10

【0021】

多数の異なるシトルリン化タンパク質又はペプチドを試験に使用して、抗シトルリン化タンパク質抗体(ACPA)を検出することができる。シトルリン化フィラグリンを使用して、いわゆる抗フィラグリン抗体(AFA)が検出された。RA自己抗体の適切な基質を見つける最初の試みにおいては、1個のシトルリン残基を含む幾つかの線状ペプチドが開発された。これらのシトルリン化ペプチドは、RA自己抗体によって特異的に認識され、より重要なことには、そのアルギニン含有対応物は認識されなかった。しかし、大部分のペプチドはRA血清のわずか30%から45%としか反応しなかったが、75%を超えるRA血清は合計9種類の試験ペプチドのうち少なくとも1種類と反応した。(シェレケンス(Schellekens)他(1998).ジャーナルオブクリニカルインベスティゲーション(J.Clin.Invest.)Vol 101:pp271-281)。線状ペプチドを使用することができるが、環式ペプチドは試験をより高感度にするが見いだされた。環式シトルリン化タンパク質/ペプチドを含む試験は、典型的には、CCP試験と称される。CCP1試験は既に高感度であるが、免疫認識性が改善された環式シトルリン化タンパク質/ペプチドの新規選択によってCCP試験の感度が少なくとも80%に増加することが見いだされた。この後者の試験は、典型的には、CCP2試験と称される。したがって、本発明のこの態様の一実施形態においては、ACPAを検出する方法は、前記試料中の抗環式シトルリン化タンパク質/ペプチドを検出することを含む。好ましくは、ACPAを検出する前記方法は、リウマチ様関節炎の診断のためのシトルリン化ペプチド及びタンパク質の使用(The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis.)プルイジン(Pruijn)GJ,ウィーク(Wiik)A,ファンベンルージ(van Venrooij)WJ.アースリシスリサーチアンドセラピー(Arthritis Res Ther)2010;12(1):203.電子出版2010 Feb 15.レビュー及び「リウマチ様関節炎に対する第1と第2の抗環式シトルリン化ペプチド(CCP1とCCP2)自己抗体試験の診断精度及び予後値の比較(A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides(CCP1 and CCP2)autoantibody tests for rheumatoid arthritis.)」ファンガーレン(van Gaalen)FA,ヴィセル(Visser)H,ホイジンガ(Huizinga)TW.アナルズオブザリウマチックディーズ(Ann Rheum Dis.)2005 Oct;64(10):1510-2に

20

30

40

50

記載のようにCCP2試験である。

【0022】

ACPAの場合と同様に、抗CarP抗体の場合も、原則的には、多数の異なるカルバミル化タンパク質又はペプチドを試験に使用して、抗カルバミル化タンパク質抗体を検出することができる。好ましい一実施形態においては、前記カルバミル化タンパク質又はペプチドは環式ペプチドである。良好なカルバミル化タンパク質はカルバミル化ウシ胎仔血清である。しかし、別の種由来の血清タンパク質も適切である。最適化後にはヒトタンパク質を使用することもできる。不可避的な背景のために、Igの大規模な欠乏なしにはヒト血清をカルバミル化型で使用することはできない。好ましい一実施形態においては、前記カルバミル化タンパク質は、フィブリノーゲン、好ましくはヒトフィブリノーゲンである。

10

【0023】

本発明の方法に使用されるペプチドは、ACPA全般の検出であれ、抗CarP抗体の検出であれ、抗Ca-Fib抗体の検出であれ、典型的には6~50アミノ酸のペプチドである。好ましくは、前記ペプチドは、12から30アミノ酸、より好ましくは18から22アミノ酸、最も好ましくは約21アミノ酸のペプチドである。上記範囲は、示した数値を含む。すなわち、12から30アミノ酸の範囲は、それぞれ12及び30アミノ酸のペプチドを含む。ペプチドは、感度及び/又は特異性に応じて、類似の線状ペプチドよりも、環式ペプチドとすることができ、又は環式ペプチドでなくともよい。環状ペプチドは、環式の性質を生じる任意の分子組成で生成され得る。任意の方法を使用して、カルバミル化、シトルリン化又は未変性型のペプチド及び又はタンパク質をプレート及び又はビーズに連結することができる。直接コーティング又はビオチン-ストレプトアビジン若しくは任意の他の利用可能なコーティング方法を使用することができる。

20

【0024】

好ましい一実施形態においては、本発明の方法に使用されるかかるペプチドは、ヒトフィブリノーゲンから誘導されるペプチドである。前記ペプチドは、好ましくは、フィブリノーゲンアルファ(図14)、フィブリノーゲンベータ(図15)又はフィブリノーゲンベータ(図16)のいずれか1種類のアミノ酸配列中に存在する12から30アミノ酸、より好ましくは18から22アミノ酸、最も好ましくは約21アミノ酸の連続アミノ酸を含む。より好ましい一実施形態においては、ペプチドは、表I、表II又は表IIIに示されたペプチドのいずれか1種類である。

30

【0025】

本発明は、さらに、上で示したように、ある形態の関節炎に罹患した、又は罹患するリスクのある、個体を分類する方法であって、前記個体の体液を含む試料が抗CarP抗体、好ましくは抗Ca-Fib抗体を含むかどうかを判定すること、及び前記試料が抗シトルリン化タンパク質抗体(ACPA)を含むかどうかを判定すること、及び前記抗CarP抗体及び/又は前記ACPAの検出に基づいて前記個体を分類することを含む、方法を提供する。

【0026】

抗CarP抗体、抗Ca-Fib抗体及びACPAは、任意の免疫グロブリンアイソタイプとすることができる。この技術は、典型的には、1つ以上のIgGサブクラスに焦点を合わせる。本発明においては、前記個体の体液を含む試料中のIgサブタイプA(IgA)とIgサブタイプG(IgG)の両方の抗CarP抗体、抗Ca-Fib抗体及び/又はACPAのレベルが、関節破壊などの臨床成績測定を予示することが見いだされた。試料は、抗CarP又は抗Ca-Fib IgGに対して陰性であり得るが、抗CarP又は抗Ca-Fib IgAに対しては陽性であり得、その逆も同様であることも見いだされた。したがって、本発明の方法の好ましい一実施形態においては、前記方法は、前記個体の体液を含む試料が、IgサブタイプIgAの抗CarP及び/又は抗Ca-Fib抗体、又はIgサブタイプIgGの抗CarP及び/又は抗Ca-Fib抗体、又はその両方を含むかどうかを判定することを含み、前記IgA及び/又はIgG抗CarP及び

40

50

／又は抗Ca-Fib抗体の検出は、前記個体が関節炎に罹患した又は罹患するリスクがあることを示す。好ましい一実施形態においては、前記方法は、さらに、前記個体の体液を含む試料がACPAを含むかどうかを判定することを含む。上述したように、本発明の方法は、ACPA陰性個体の不均一な群を更に分割するのに特に有用である。本発明の方法を使用すると、このACPA陰性群を、抗CarP及び／又は抗Ca-Fib抗体陽性であり、関節炎に罹患した又は罹患するリスクがあると分類することができる群と、関節炎に罹患していない又は関節炎に罹患するリスクがないと分類される抗CarP及び／又は抗Ca-Fib抗体陰性群の群に分割することができる。この判定を個体ごとに行うこともできる。したがって、本発明の方法は、好ましくは、さらに、前記個体の体液を含む試料が抗シトルリン化タンパク質抗体（ACPA）を含むかどうかを判定することを含み、前記試料の前記ACPAレベルは検出限界及び又は陽性のカットオフ未満である。

10

【0027】

抗CarP抗体、好ましくはアイソタイプIgA若しくはアイソタイプIgG、又はその両方及びACPAの存在について試験された個体の試料を、結果に基づいて以下のように分類することができる。

- a) 抗CarP及び／又は抗Ca-Fib抗体+、ACPA-試料、
- b) 抗CarP及び／又は抗Ca-Fib抗体+、ACPA+試料、
- c) 抗CarP及び／又は抗Ca-Fib抗体-、ACPA+、及び
- d) 抗CarP及び／又は抗Ca-Fib抗体-、ACPA-試料

【0028】

結果a)、b)及びc)は、関節炎に現在罹患しているリスクが高い又は関節炎を発症するリスクがある個体の試料として、試料を分類するものである。結果d)は、関節炎に現在罹患している又は発症するリスクが低い個体の試料として、試料を分類するものである。前記個体が、前記試料を群d)に分類するよりも未分化関節炎を呈する場合、前記個体は自然寛解の可能性が高いことを示す。かかる個体は、長期的に抗関節炎治療の利点がないと予想される。本発明は、さらに、未分化関節炎に罹患した個体の体液を含む試料をタイプ分けする方法であって、前記試料が抗CarP抗体、好ましくは抗Ca-Fib抗体を含むかどうかを判定すること、及び前記試料が前記抗CarP抗体、好ましくは前記抗Ca-Fib抗体に対して陰性であると判定されたときに、前記試料を前記関節炎の自然寛解の可能性が平均よりも高い個体に由来するとタイプ分けすること、及び前記試料が前記抗CarP抗体、好ましくは前記抗Ca-Fib抗体に対して陽性であると判定されたときに、前記試料をRAを有する又はRAに進行する可能性が平均よりも高い個体に由来するとタイプ分けすることを含む、方法を提供する。前記平均よりも高い可能性は、典型的には、未分化関節炎を呈する幾人かの選択されていない個体の平均可能性と前記可能性を比較することによって達せられる。

20

30

【0029】

別の一態様においては、本発明は、ある形態の関節炎に罹患し、前記関節炎のより重篤な形態を発症するリスクが高い個体の関節炎の重症度を推定する方法であって、前記選択された個体の体液を含む試料が抗ホモシトルリン含有タンパク質抗体（抗CarP抗体）、好ましくは抗ホモシトルリン含有フィブリノーゲン抗体（抗Ca-Fib抗体）を含むかどうかを判定すること、及び前記試料中の前記抗CarP抗体、好ましくは前記抗Ca-Fib抗体の検出に基づいて前記関節炎の重症度を推定することを含む、方法を提供する。

40

【0030】

更に別の一態様においては、本発明は、関節炎の発症の予後を前記関節炎に罹患した個体に提供する方法であって、前記個体の体液を含む試料が抗CarP抗体、好ましくは抗Ca-Fib抗体を含むかどうかを判定すること、及び前記試料中の前記抗CarP抗体、好ましくは抗Ca-Fib抗体の検出に基づいて前記関節炎の今後の重症度を推定することを含む、方法を提供する。前記方法は、好ましくは、ACPAを決定する方法と組み合わせられ、前記試料であり、前記抗CarP及び／又は抗Ca-Fib抗体試験と前記

50

A C P A 試験の組合せ結果を使用して、前記個体の前記関節炎の今後の重症度を推定する。

【 0 0 3 1 】

抗 C a r P 抗体、好ましくは抗 C a - F i b 抗体、及び/又は A C P A の存在について試験される試料は、原則的には、個体の体液を含む限り、任意のタイプの試料とすることができる。しかし、典型的には、試料は体液の試料である。好ましい一実施形態においては、体液を含む前記試料は、血清試料又は滑液試料である。

【 0 0 3 2 】

関節炎は、上述したように、複合疾患であり、多数の異なる形態の関節炎が現在特定されている。個体が罹患した又は罹患するリスクがある関節炎は、好ましくは、リウマチ様関節炎、若年性関節炎、乾せん性関節炎、骨関節炎、リウマチ性多発筋痛、強直性脊椎炎、反応性関節炎、痛風、偽痛風、自己免疫性関節炎、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、線維筋痛、ライム病、未分化関節炎、非リウマチ性関節炎又は脊椎関節症から選択される関節炎である。より好ましくは、個体が罹患した又は罹患するリスクがある関節炎は、リウマチ様関節炎、乾せん性関節炎、骨関節炎、リウマチ性多発筋痛、強直性脊椎炎、反応性関節炎、痛風、偽痛風、自己免疫性関節炎、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、線維筋痛、ライム病、未分化関節炎、非リウマチ性関節炎又は脊椎関節症から選択される関節炎である。好ましくは、前記関節炎は、リウマチ様関節炎、若年性関節炎、より好ましくは若年性特発性関節炎、又は未分化関節炎から選択される。より好ましくは、前記関節炎は、リウマチ様関節炎又は未分化関節炎から選択される。

【 0 0 3 3 】

本発明は、さらに、ある形態の関節炎に罹患した個体の関節炎をタイプ分けする方法であって、前記個体の体液を含む試料が抗カルバミル化タンパク質（抗 C a r P ）抗体、好ましくは抗カルバミル化フィブリノーゲン（抗 C a - F i b ）抗体を含むかどうかを判定することを含む、方法を提供する。関節炎は、前記抗 C a r P 及び/又は抗 C a - F i b 抗体の検出有無に基づいてタイプ分けすることができる。前記抗 C a r P 抗体、好ましくは前記抗 C a - F i b 抗体が検出される試料は、リウマチ様関節炎の個体に由来する可能性がより高い。したがって、この方法は、単独で、又は前記個体が R A に罹患した可能性を評価する別の R A 試験と組み合わせて、使用することができる。好ましい一実施形態においては、前記更なる試験は、A C P A の存在試験、好ましくは C C P 2 試験及び又はリウマチ因子試験を含む。

【 0 0 3 4 】

本発明によれば、抗 C a r P 抗体は、R A 発症前の無症候の健康な個体において検出することができる。したがって、健康な集団においても、抗 C a r P 抗体の検出は、後年の R A 又は持続性関節炎の発症リスクがある患者の早期発見に有用である。さらに、抗 C a r P 抗体の検出は、好ましくは現行の R A 分類を行う前に、早期治療の利点がある人を特定するのに有用である。

【 0 0 3 5 】

更に別の一態様においては、本発明は、個体がある形態の関節炎を発症するリスクがある又は罹患したかどうかを判定する方法であって、前記個体は、罹患していないと考えられ、又は好ましくは体液を含む試料が収集された時点で関節炎に罹患しておらず、前記方法が、前記個体の体液を含む試料が抗カルバミル化タンパク質（抗 C a r P ）抗体を含むかどうかを判定することを含む、方法を提供する。好ましい一実施形態においては、前記抗 C a r P 抗体が抗カルバミル化フィブリノーゲン（抗 C a - F i b ）抗体である、本発明による方法が提供される。前記抗 C a r P 抗体、好ましくは前記抗 C a - F i b 抗体が検出される試料は、関節炎、特に R A に近い将来、特に試料収集日から 5 年以内に、特に 3 年以内に、より具体的には試料収集日から 1 . 5 年以内に、罹患又は発症するリスクがある個体に由来する可能性がある。この方法は、単独で、又は前記リスクを評価する別の R A 試験と組み合わせて使用することができる。好ましい一実施形態においては、前記更なる試験は、A C P A の存在試験、好ましくは C C P 2 試験及び又はリウマチ因子試験を

10

20

30

40

50

含む。

【0036】

別の態様においては、本発明は、個体の体液中の抗CarP抗体、好ましくは抗Ca-Fib抗体の検出キットであって、カルバミル化タンパク質又はペプチドを含む、キットを提供する。好ましくは、前記カルバミル化タンパク質又はペプチドは、カルバミル化フィブリノーゲン又はフィブリノーゲン由来のペプチドである。好ましい一実施形態においては、前記タンパク質又はペプチドは、上記カルバミル化タンパク質又はペプチドである。特に、前記キットは、フィブリノーゲンアルファ(図14)、フィブリノーゲンベータ(図15)又はフィブリノーゲンベータ(図16)のいずれか1種類のアミノ酸配列中に存在する12から30アミノ酸、より好ましくは18から22アミノ酸、最も好ましくは約21アミノ酸の連続アミノ酸を含む少なくとも1種類のペプチドを含む。より好ましい一実施形態においては、前記キットは、表I、表II又は表IIIに示されたペプチドの少なくとも1種類を含む。

10

【0037】

やはり上述したように。好ましい一実施形態においては、前記キットは、さらに、抗ヒトIgG抗体及び/又は抗ヒトIgA抗体を含む。好ましくは、前記抗ヒトIg抗体は、検出することができる標識を含む。かかる標識の非限定的例は、HRP又はAPによる直接標識化である。あるいは、前記キットは、好ましくは、さらに、使用した抗ヒトIg抗体に特異的である別の抗体を含む。この実施形態においては、前記別の抗体は、ビオチン、DIGなどの検出可能な標識を含む。この入れ子(nesting)が連続できることは言うまでもなく、標識は、最後及び/又は1個以上(前)の抗体上に存在する。好ましい一実施形態においては、前記抗ヒトIg抗体は抗ヒトIgA抗体を含む。より好ましい一実施形態においては、前記キットは、抗ヒトIgA抗体及び抗ヒトIgG抗体を含む。上記抗ヒトIg抗体は、典型的には、完全抗体であるが、抗原結合部位を含む断片も抗体という用語の使用の範囲内である。同様に、現在、ヒトIgに特異的に結合するように作製することができる多種多様な結合タンパク質又はペプチドが利用可能である。かかるヒトIg特異的結合タンパク質又はペプチドは、本明細書に定義された抗ヒトIg抗体の等価物である。同様に、入れ子設定における1個以上の更なる抗体は、入れ子ツリーの前方の抗体及び/又は結合タンパク質/ペプチドに特異的に結合する結合タンパク質及び/又はペプチドで置換することができる。

20

30

【0038】

特に好ましい一実施形態においては、前記キットは、更にシトルリン化タンパク質又はペプチドを含む。好ましい一実施形態においては、前記タンパク質又はペプチドは、上記シトルリン化タンパク質又はペプチドである。やはり上述したように、前記シトルリン化タンパク質又はペプチドは、好ましくは、タンパク質又は環式ペプチドである。好ましくは、前記キットは、CCP1又はCCP2試験の環式シトルリン化ペプチドを含む。好ましくは、前記キットは、CCP試験、好ましくはCCP2試験のすべての環式ペプチドを含む。

【0039】

本発明の方法は、上述したように、好ましくは、別の関節炎分類指標試験と組み合わせられる。したがって、本発明の方法の好ましい一実施形態においては、前記方法は、さらに、更なる因子を前記個体の関節炎分類指標として決定することを含む。好ましくは、前記更なる因子は、ACPA、リウマチ因子、C反応性タンパク質、及び/又は赤血球沈降速度を決定することを含む。

40

【0040】

カルバミル化は、タンパク質又はペプチドにホモシトルリン残基を生成する修飾を施すプロセスと本明細書では定義される。本明細書においては、カルバミル化タンパク質若しくはペプチド又はその集まりを参照する場合、ホモシトルリン修飾を有する前記タンパク質若しくはペプチド、又はホモシトルリン修飾を有するタンパク質若しくはペプチドの集まりを参照されたい。

50

【0041】

本発明は、さらに、個体がある形態の関節炎に罹患した、又は罹患するリスクがあるかどうかを判定するのに使用される抗CarP抗体、好ましくは抗Ca-Fib抗体、及びACPAを提供する。本発明は、さらに、関節炎の分類に使用される抗CarP抗体、好ましくは抗Ca-Fib抗体、及びACPAを提供する。前記決定及び/又は分類は、上記決定又は分類である。

【0042】

本発明は、さらに、ある形態の関節炎に罹患した個体が、前記関節炎のより重篤な形態を発症するリスクが高いかどうかを判定する方法であって、関節炎に罹患したが、最も重篤な形態の関節炎ではない個体を選択すること、及び前記選択された個体の体液を含む試料が抗カルバミル化タンパク質抗体（抗CarP抗体）を含むかどうかを判定することを含み、前記抗CarPの検出が、前記個体が前記関節炎のより重篤な形態を発症するリスクが高いことを示す、方法を提供する。好ましい一実施形態においては、前記抗CarP抗体が抗カルバミル化フィブリノーゲン抗体（抗Ca-Fib抗体）である、本発明による方法が提供される。

【0043】

本明細書においては、抗CarP抗体、抗Ca-Fib抗体又はACPAの検出、測定又は評価を参照する場合、前記参照は、1種類を超える抗CarP抗体、抗Ca-Fib抗体及び/又は1種類を超えるACPAが検出、測定又は評価されることを含む。抗CarP又は抗Ca-Fib抗体は、ホモシトルリン修飾それ自体を認識することができ、より典型的には、ホモシトルリン修飾のすぐ近くのタンパク質又はペプチドのアミノ酸の1個以上に関連した前記修飾を認識することができる。本発明の方法又はキットは、1を超える特異性の抗CarP抗体及び/又は抗Ca-Fib抗体が検出、測定又は評価されるときにより正確である。本発明の方法は、したがって、好ましくは、前記試料中の2種類以上、好ましくは3種類以上、より好ましくは5種類以上、より好ましくは少なくとも7種類の抗CarP及び/又は抗Ca-Fib抗体を測定することを含む。同様に、本発明のキットは、好ましくは、2種類以上、好ましくは3種類以上、より好ましくは5種類以上、より好ましくは少なくとも7種類のカルバミル化タンパク質及び/又はペプチド、好ましくはフィブリノーゲン及び/又はフィブリノーゲン由来のペプチドを含む。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1A】抗CarP抗体を検出する新規特異的アッセイの開発。(A)ELISAにおけるカルバミル化FCS及び未変性FCSに対する抗CarP抗体陽性標準の用量反応曲線。

【図1B】抗CarP抗体を検出する新規特異的アッセイの開発。Ca-FCSで被覆されたELISAプレートに結合した抗CarP抗体が、示した液相阻害剤を用いたプレインキュベーションによって阻害された阻害研究。Ca-FCSのみが抗CarP抗体の結合を阻害した。

【図1C】抗CarP抗体を検出する新規特異的アッセイの開発。Ca-FCSとFCSの等しい添加量を示すクーマシー染色、及び陰性試料ではなく抗CarP陽性試料の血清試料によるFCS添加レーンではなくCa-FCS添加レーンの陽性染色を示すウエスタンプロット。

【図2】抗CarP IgG及びIgA抗体はRA血清中に存在する。健康な対照とRA患者の血清のセットにおいて抗CarP IgG及びIgAを検出するためにELISAを実施した。カットオフは、健康な対照の平均+標準偏差×2によって設定された。検量線に基づく計算に従って任意単位/mlとして表される力価を示す。グラフの下には試験試料数と陽性割合の両方を示す。

【図3】抗CarP抗体及びACPAは、2つの別々の自己抗体系である。ACPA及び/又は抗CarP抗体に対して陽性及び陰性のRA患者の割合を示した円グラフ。

【図4】抗CarP IgA抗体は、未分化関節炎(UA)からRAへの転換に関連する

10

20

30

40

50

。ベースラインでUAを呈する患者の血清を、抗CarP IgG及びIgA抗体について測定し、1年の経過観察でRAに転換するかどうか分析した。示したデータはACPA陽性に基づいても分割される。IgA抗CarP抗体は、UA集団からのRAの発症と強く関連する。

【図5】抗CarP IgA抗体は、RAにおけるより重篤な放射線学的進行に関連する。関節破壊の程度及び割合を、ACPA及び抗CarP抗体に対する陽性に基づいて分割されたRA患者において分析した。抗CarP IgA抗体陽性は、ACPA陰性とACPA陽性RA患者の両方においてより重篤な放射線学的損傷に関連する。

【図6A】シトルリン化及びカルバミル化の説明。シトルリン化及びカルバミル化は、異なるアミノ酸上で異なる機序によって起こるが、類似の最終生成物を生成する。

10

【図6B】シトルリン化及びカルバミル化の説明。シトルリン化及びカルバミル化は、異なるアミノ酸上で異なる機序によって起こるが、類似の最終生成物を生成する。

【図7】カルバミル化タンパク質に対する抗体は、RA患者の血清中に存在する。健康な対照(NHS)又はRA患者(RA)の血清由来のIgG(A、B)及びIgA(D、E)と、非修飾FCS(FCS)又はカルバミル化FCS(Ca-FCS)で被覆された壁との反応性を示す。415nmにおける吸光度として表されたデータ。(C、F)FCSの吸光度単位は、Ca-FCSの吸光度単位から減算され、特異的抗カルバミル化タンパク質反応を示す。

【図8】抗CarP抗体とACPAは、2つの別々の自己抗体系である。(A)幾つかの形態のFibペプチドに対するRA患者由来の76種類の血清のIgG反応性を示す。(B、C)Ca-FCS又はCi-FCSに結合した抗体は液相阻害剤を用いたプレインキュベーションによって阻害され、示される。(D)FCS、Ca-FCS及びCi-FCSは、SDS-pageゲルによって分離され、プロットされた。プロット上のタンパク質に対して反応性である抗体の存在は、これらのプロットを抗CarP陽性ACPA陰性及び抗CarP陰性ACPA陽性血清と一緒にインキュベートすることによって分析された。

20

【図9】抗CarP抗体は、可変ドメインを介してCa-Fibに結合する。(A)54名の健康な対照及び214名のRA患者のFib、Ci-Fib及びCa-Fibに対するIgG反応性をELISAによって分析した。(B)抗Ca-Fib反応性の特異性を阻害研究によって確認した。1個の試料を示す。データは、PBSによる阻害に関して表される。(C)精製IgG及びF(ab')₂の分子的性質は、クーマシー染色SDS-pageゲルによって確認された。(D)F(ab')₂断片は、2名の抗CarP陽性患者及び2名の負の対照の精製IgGから生成された。患者由来のF(ab')₂のみCi-Fib及びCa-Fibと反応した。(E)阻害実験によれば、F(ab')₂も必ずしもCi-FibとCa-Fibの交差反応性ではないことが確認された。

30

【図10】抗CarP IgG及びIgA抗体はRA血清中に存在する。(A、B)ELISAにおけるCa-FCS及びFCSに対する抗CarP抗体陽性標準(IgG及びIgA)の用量反応曲線(C、D)健康な対照(NHS)及びRA患者の血清において抗CarP IgG及びIgAを検出するためにELISAを実施した。上記方法に記載のように、カットオフは、健康な対照の平均+標準偏差×2によって設定された。反応性は、任意単位/mLとして表される。試験試料数及び陽性%をグラフの下に示す。(E、F)抗CCP2及び/又は抗CarP抗体に対して陽性及び陰性のRA患者%を示す円グラフ。(G、H)抗CCP2に対して陰性抗CarP IgG又はIgA陽性患者%を示す円グラフ。

40

【図11】抗CarP IgG抗体は、ACPA陰性RAにおいてより重篤な放射線学的進行に関連する。関節破壊の程度及び割合は、含まれるすべてのRA患者で分析され、ACPA陰性又はACPA陽性サブグループに対して別々に分析された(図13)。関節破壊の重症度を中央値シャープ/ファンデルハイデ(Sharp/van der Heijde)スコア(SHS)としてY軸上に、経過観察年数をX軸上に示す。X軸の下には各時点の患者数を示す。抗CCP2陰性RA患者の放射線学的進行を示す。P値は、

50

方法のセクションに記載のように分析モデルから誘導される。

【図12A】抗CarP IgG抗体は、疾患前(pre-disease)からRAへの転換に関連する。(A)ベースラインで未分化関節炎(UA)を呈する患者の血清を、抗CarP IgG抗体について測定し、1年の経過観察でRAに転換するかどうか分析した。示したデータはACPA陽性に基づいても分割される。抗CarP抗体は、UA集団からのRAの発症と強く関連する。

【図12B】(B)ベースラインで関節痛を呈する患者の血清においても、抗CarP抗体はRAの発症を予示する。

【図12C】(C)RAを発症しない、又は後年RAを発症する、健康な人の血清を抗CarP陽性について比較する。抗CarPの存在は、今後のRAの発症に関連する。

【図13】抗CarP IgA抗体は、RAにおけるより重篤な放射線学的進行に関連する。関節破壊の程度及び割合を、ACPA及び抗CarP抗体に対する陽性に基づいて分割されたRA患者において分析した。抗CarP IgG抗体に対する陽性は、ACPA陰性RA患者においてより重篤な放射線学的損傷に関連する。

【図14】フィブリノーゲンアルファのアミノ酸配列。

【図15】フィブリノーゲンベータのアミノ酸配列。

【図16】フィブリノーゲンガンマのアミノ酸配列。

【図17】抗CarP抗体は、若年性関節炎に罹患した患者の血清中に存在する。健康な小児(ctr)の血清及び若年性関節炎に罹患した患者の血清中の抗CarP IgGを検出するためにELISAを実施した。上記方法に記載のように、カットオフは、健康な対照の平均+標準偏差×2によって設定された。反応性は、任意単位/mLとして表される。試験試料数及び陽性%をグラフの下に示す。

【0045】

[実施例]

[実施例1]

材料及び方法

抗原の生成

抗原源として、本発明者らはウシ胎仔血清(FCS)を使用した(Bodenco、バッチNo. 212-192909)。これをカルバミル化し、シトルリン化し、又は無修飾源として使用した。

【0046】

カルバミル化FCS(Ca-FCS)は、FCSを再蒸留水に4mg/mlまで希釈することによって生成された。シアン酸カリウム(sigma、cat No. 215074)を80mg/mlで添加した。37で12時間インキュベーション後、試料を再蒸留水で徹底的に透析した。

【0047】

対照として、本発明者らは、シトルリン化FCS(Ci-FCS)も作製した。この目的のために、本発明者らは、FCS(24mg/ml)50ulを0.5M Tris-HCl pH7.6 24ul+0.125M CaCl₂ 15ul+PAD4(Sigma P1584)31ulと一緒に37で24時間インキュベートした。

【0048】

ELISAによる抗CarP抗体の検出

非修飾FCS及びCa-FCSを10ug/ml(pH9.6 0.1M炭酸塩-炭酸水素塩緩衝剤で希釈)で50ulをNuncイムノプレート(Thermo scientific、cat No. 430341)に4で終夜塗布した。0.05% tween(Sigma、cat No. 27,434-8)(PT)を含むリン酸緩衝食塩水(PBS)で4回洗浄後、PBS/1%ウシ血清アルブミン(BSA)(sigma、cat No. A2153)100ulを37で1時間インキュベートすることによってプレートをブロックした。追加の洗浄後、血清を50ul中で1/50(PBS/0.05% tween/1%BSA緩衝剤(PTB)中)でFCSとCa-FCSの両方の被覆ウェ

10

20

30

40

50

ルにインキュベートし、37℃で1時間インキュベートした。標準血清の(PTB希釈)段階希釈物をCa-FC5被覆ウェル上でインキュベートした。洗浄後、50ulの1/5000(PTB)希釈ウサギ抗ヒトIgG抗体(Dako、cat No. A0423)又は1/1000(PTB)希釈ウサギ抗ヒトIgA抗体(Dako、cat No. A0262)と一緒にウェルを37℃で1時間インキュベートすることによって結合ヒトIgG又はIgAを検出した。洗浄後、ウェルを50ulの1/2000(PTB)希釈ヤギ抗ウサギIgG HRP標識抗体(Dako、cat No. P0448)と一緒に37℃で1時間インキュベートした。最後の洗浄後、50ulの2,2'-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾ-チアゾール-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩(ABTS)及びH₂O₂をインキュベートし、415nmにおける吸光度を標準ELISAリーダーによって測定して、HRP酵素活性を可視化した。

10

【0049】

ウエスタンブロットによる抗CarP抗体の検出

FC5とCa-FC5の両方を通常の10%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲルに載せ、Hybond-C Extra膜(Amersham、Digeem、ベルギー)に移した。次いで、PBS/0.05%Tweenで洗浄後、ブロットをブロッキング緩衝剤(3%ELK Milk/PBS/0.05%Tween)中で室温で1時間インキュベートした。続いて、ブロットをブロッキング緩衝剤で1:500希釈された血清5mlと一緒に室温で1時間インキュベートした。PBS/0.05%Tweenで3回洗浄後、ブロッキング緩衝剤で1:50000希釈された西洋ワサビペルオキシダーゼ複合化ウサギ抗ヒトIgG(DAKO、Heverlee、ベルギー)3mlと一緒にブロットを室温で1時間インキュベートした。次に、ブロットを洗浄し、結合した抗体を増感化学発光(ECL; Amersham)によって可視化した。等しいタンパク質添加は、クーマシーブリリアントブルー(Bio-Rad、Veenendaal、オランダ)によって確認された。

20

【0050】

血清及び滑液

分析された血清は、ライデン早期関節炎(Leiden Early Arthritis)クリニック(EAC)コホートに参加した患者に由来した。ライデンEACは、ライデン大学医療センターのリウマチ学部門(Department of Rheumatology of the Leiden University Medical Center)で1993年に開始された関節炎を最近発症した患者の初期コホート(症候持続時間<2年)である[15]。すべてのRA患者は、1年の経過観察(EACコホート)内に米国リウマチ学会(American College of Rheumatology)(以前は、American Rheumatism Association)1987年改訂のRA分類基準[16]を満たした。合計1007名の患者を分析し、そのうち582名はRAと診断され、425名はUAと診断され、そのうち151名は経過観察時にRAを発症した。これらの患者試料をやはりライデン地区由来の280名の健康な対照の試料と比較した。RA患者の血清/滑液ペアの追加セットを分析した。プロトコルは、関連する現地の倫理委員会によって認可され、全参加者はインフォームドコンセントを与えた。

30

40

【0051】

ACPA検出のためのELISA

ベースラインで酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)(Immunoscan RA Mark 2; Eurodiagnostica、Arnhem、オランダ)によって収集された血清中の全IgG抗CCP2をACPAの尺度として測定した。25単位/mlを超える値の試料を製造者の指示に従って陽性とみなした。CCP2に対する抗体を有する個体をACPA陽性とみなした。

【0052】

抗Cafib抗体検出のためのELISA

50

非修飾 Fib 及び Ca - Fib を 20 µg/ml で 50 µl (pH 9.0 PBS 希釈) を Nunc Maxisorp プレートに終夜塗布した。PBSTween で洗浄後、pH 9.0 PBS / 2% BSA 200 µl を 4 で 2 時間インキュベートすることによってプレートをブロックした。追加の洗浄後、RIA 緩衝剤 (10 mM Tris pH 7.6; 350 mM NaCl; 1% Triton X; 0.5% デオキシコール酸 Na; 0.1% SDS) (Sigma) で 1/50 希釈された血清 50 µl と一緒にウェルを氷上で 3 時間インキュベートした。それに続くインキュベーションはすべて RIA 緩衝剤中で実施される。標準として、陽性血清プールの段階希釈を使用した。氷上で 2 時間インキュベートされた HRP 標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体 (DAKO) を使用してヒト IgG を検出した。最後の洗浄後、HRP 酵素活性を ABTS を使用して可視化した。本発明者らは、Fib 及び Ca - Fib の吸光度を aU/mL に変換した。本発明者らは、陽性応答のカットオフを健康な対照の特異的抗 CarP 反応性の平均 + 2 × 標準偏差として設定した。

10

【0053】

本発明者らは、健康な小児の 67 個の血清及び若年性関節炎に罹患した患者の 110 個の血清を分析した。

【0054】

統計

ロジスティック回帰を用いた社会科学用統計パッケージ (Statistical Package for the Social Sciences) (SPSS) 17.0 を使用してデータを解析した。0.05 未満の P 値を統計的に有意とみなした。

20

[実施例 2]

【0055】

材料及び方法

患者及び対照血清

分析された血清は、ライデン早期関節炎クリニック (EAC) コホートに参加した患者に由来した。ライデン EAC は、ライデン大学医療センターのリウマチ学研究部門で 1993 年に開始された関節炎を最近発症した患者の初期コホート (症候持続時間 < 2 年) である (42)。すべての RA 患者は、1 年の経過観察内に米国リウマチ学会 (以前は、American Rheumatism Association) 1987 年改訂の RA 分類基準 (43) を満たした。合計 571 名の RA 患者が分析に含まれた。患者試料をやはりライデン地区に住んでいる 305 名の健康な対照の試料と比較した。プロトコルは現地の倫理委員会によって認可され、インフォームドコンセントが得られた。

30

【0056】

ELISA による抗 CarP 抗体の検出

手短に述べると、非修飾 FCS 及び修飾 FCS を Nunc Maxisorp プレート (Thermo scientific) 上に終夜塗布した。洗浄及びブロッキング後、ウェルを血清と一緒にインキュベートした。結合ヒト IgG 又は IgA をウサギ抗ヒト IgG 又は IgA 抗体 (DAKO) を使用して検出した。続いて、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Dako)。最後の洗浄後、HRP 酵素活性を ABTS を使用して可視化した (44)。F(ab)2 を含めて、FCS 及び Fib に基づくタンパク質修飾及び ELISA アッセイのより詳細な説明は、オンライン (SI - 材料及び方法 (SI - materials and Methods)) で利用可能である。本発明者らは、陽性応答のカットオフを健康な対照の特異的抗 CarP 反応性の平均 + 2 × 標準偏差として設定した。ACPA の検出及びウェスタンブロッティングの方法はオンライン (SI - 材料及び方法) で利用可能である。

40

【0057】

Fib ペプチドのための ELISA

ストレプトアビジン (Invitrogen) を 2 µg/ml で 100 µl を Nunc プレート上に 4 で終夜塗布した。洗浄後、アルギニン、シトルリン、ホモシトルリン又

50

はリジンを含むFibペプチド(図8A)(45)を10 μ g/mlでPTB100 μ l中で室温で1時間インキュベートした。次に、これらの抗原に対して反応性である抗体の反応性を上述したように検出した。

【0058】

阻害研究

抗CarP抗体とACPAが交差反応性抗体であるかどうか判定するために、本発明者らは阻害研究を実施した。ACPAと抗CarP抗体の両方に陽性である自己抗体陽性血清試料を、漸増濃度の非修飾FCS、Ca-FCS、Ci-FCS又はCCP1ペプチドのシトルリン若しくはアルギニン含有形態(46)と一緒にプレインキュベートした。室温(RT)でプレインキュベーション後、上述したように、Ca-FCS及びCi-FCSに対する反応性について試料を試験した。Ci-FibとCa-Fibの両方に陽性である血清及びF(ab')₂試料をFib、Ci-Fib及びCa-Fibと一緒に4で終夜プレインキュベートし、続いてFib ELISAで分析した(SI-材料及び方法)。

10

【0059】

放射線学的進行

EACコホートにおいては、長軸方向で得られた手足のX線像を、シャープノファンデルハイデ法に従って採点した(47)。採点及び分析は依然に詳述されている(24)。データを直接、又は反復測定分析を使用して各患者に対して得られた長軸方向のデータを最適に利用して、分析する(24)。より詳細な情報がオンライン(SI-材料及び方法)で利用可能である。

20

【0060】

抗原の生成

本発明者らはカルバミル化タンパク質に対する抗体がRA患者の血清中に存在するかどうか、又はどのタンパク質をそれらが認識するか知らなかったため、本発明者らは多様なセットのカルバミル化タンパク質の試験を開始して、できるだけ多くの抗CarP反応性を検出する可能性を最大にした。この目的のために、本発明者らは、カルバミル化された、シトルリン化された、又は未処理のままのウシ胎仔血清(FCS)(Bodenco)を使用した。カルバミル化FCS(Ca-FCS)を生成するために、FCSをH₂Oで4mg/mlに希釈し、シアン酸カリウム(Sigma)を濃度1Mまで添加した。37で12時間インキュベーション後、試料をH₂Oで徹底的に透析した。5mg/mlフィブリノーゲン(Fib)を0.5Mシアン酸カリウムと一緒に4で3日間インキュベートし、続いてPBSで徹底的に透析することによって、カルバミル化フィブリノーゲン(Ca-Fib)を作製した。0.1M Tris-HCl pH7.6、0.015M CaCl₂及び40U PAD4(Sigma)を含む体積1mL中でFCS又はFib 10mgを37で24時間インキュベートすることによって、シトルリン化FCS(Ci-FCS)及びシトルリン化フィブリノーゲン(Ci-Fib)を作製した。本発明者らは、質量分析によってシトルリン及びホモシトルリン残基の存在を確認した。Fibの場合、本発明者らは、本発明者らが分析したタンパク質セグメント中に、広範なシトルリン化及び完全なカルバミル化を認めた。

30

40

【0061】

ELISAによる抗CarP抗体の検出

非修飾FCS及び修飾FCSを10 μ g/mlで50 μ l(pH9.6 0.1M炭酸塩-炭酸水素塩緩衝剤希釈)(CB)をNunc Maxisorpプレート(Thermo scientific)上に終夜(ON)塗布した。0.05% tween(Sigma)(PT)を含むPBSで洗浄後、PBS/1%ウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma)100 μ lを4で6時間インキュベートすることによってプレートをブロックした。追加の洗浄後、PBS/0.05% tween/1%BSA緩衝剤(PTB)で1/50希釈された血清50 μ lと一緒にウェルを氷上で終夜インキュベートした。それに続くインキュベーションはすべてPTB中で実施される。標準として、陽性血清プー

50

ルの段階希釈を使用した。氷上で3.5時間インキュベートされたウサギ抗ヒトIgG抗体(DAKO)又はウサギ抗ヒトIgA抗体(Dako)を使用してヒトIgG又はIgAを検出した。洗浄後、ウェルを氷上でHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(Dako)と一緒に3.5時間インキュベートした。最後の洗浄後、HRP酵素活性を依然に記述されたようにABTSを使用して可視化した(25)。健康な対象(n=305)の血清を対照として使用した。本発明者らは、Ca-FCSとFCSの両方の吸光度をaU/mLに変換し、FCSのバックグラウンド信号(aU/mL)をCa-FCSの信号(aU/mL)から減算して、特異的抗CarP反応性を分析した(図7)。本発明者らは、陽性応答のカットオフを健康な対照の特異的抗CarP反応性の平均+2×標準偏差として設定した。

10

【0062】

フィブリノーゲンのELISA

非修飾Fib Ci-Fib及びCa-Fibを20µg/mlで50µl(pH9.0 PBS希釈)をNunc Maxisorpプレートに終夜塗布した。PTで洗浄後、pH9.0 PBS/2%BSA 200µlを4で2時間インキュベートすることによってプレートをブロックした。追加の洗浄後、RIA緩衝剤(10mM Tris pH7.6; 350mM NaCl; 1%TritonX; 0.5%デオキシコール酸Na; 0.1%SDS)(Sigma)で1/50希釈された血清50µlと一緒にウェルを氷上で3時間インキュベートした。それに続くインキュベーションはすべてRIA緩衝剤中で実施される。標準として、陽性血清プールの段階希釈を使用した。氷上で2時間インキュベートされたHRP標識ウサギ抗ヒトIgG抗体(DAKO)を使用してヒトIgGを検出した。最後の洗浄後、HRP酵素活性をABTSを使用して可視化した。本発明者らは、214名のRA患者の血清及び54名の健康な対象の血清を対照として分析した。本発明者らは、Fib Ci-Fib及びCa-Fibの吸光度をaU/mLに変換した。本発明者らは、陽性反応のカットオフを健康な対照の特異的抗CarP反応性の平均+2×標準偏差として設定した。これらのアッセイを3回繰り返すと、同じデータを示した。

20

【0063】

F(ab')₂調製物

2つの抗CarP陽性及び2つの対照血清由来の全IgGをHiTrap(商標)タンパク質A HPカラム(GE healthcare)によって製造者によって提供されたカラムのプロトコルに従って単離した。F(ab')₂断片は、F(ab')₂調製キット(Thermo Scientific)を使用して製造者によって提供されたプロトコルに従って精製IgG試料から作製された。本発明者らは、完全IgG及びF(ab')₂の分子的性質をクーマシー染色SDS-pageゲルを使用して確認した。これらのF(ab')₂を上述したようにELISAに使用した。今回は、HRP標識ウサギ抗ヒトIgG、IgA、IgMカップ、ラムダ抗体(抗軽鎖)(Dako)又はHRP標識ウサギ抗ヒトIgG(Dako)を使用した。

30

【0064】

ELISAによるACPAの検出

ACPAをCCP2 ELISA(Immunoscan RA Mark 2; Eurodiagnostica, Arnhem、オランダ)によって測定した。25単位/mlを超える値の試料を製造者の指示に従って陽性とみなした。少数のACPA陽性RA患者は抗CCP2反応性の範囲外にあることもあり、したがって、両方の用語を使用して、本発明者らの分析に使用されたものを明示することになる。

40

【0065】

Ci-FCSに対するACPA反応性を、Nunc MaxisorpプレートにおいてCBで希釈されたCi-FCS(50µl/ウェル 10µg/ml)で4で終夜被覆されたELISAプレートを使用して検出した。プレートをPTで洗浄し、続いてPBS/1%BSA溶液100µlを使用して37で1時間ブロッキングした。洗浄後、血

50

清をPTB50 μ lで1/50希釈でインキュベートし、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。洗浄後、ヒトIgA及びIgGを上述したように検出した。

【0066】

ウエスタンブロットによる抗CarP抗体の検出

FCS、Ca-FCS及びCi-FCSを10%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲルに載せ、Hybond-C Extra膜(Amersham)に移した。PTで洗浄後、ブロットをブロッキング緩衝剤(3%ELK Milk/PBS/0.05%Tween)中で室温で1時間インキュベートした。続いて、ブロットをブロッキング緩衝剤で1:500希釈された血清2.5mlと一緒に室温で1.5時間インキュベートした。血清は、ELISAで測定して、ACPA陽性抗CarP陰性又はACPA陰性抗CarP陽性であった。PTで3回洗浄後、ブロッキング緩衝剤で希釈されたHRP標識ウサギ抗ヒトIgG5mlと一緒にブロットを室温で1時間インキュベートした。次に、ブロットを洗浄し、結合した抗体を増感化学発光(Amersham)によって可視化した。

10

【0067】

放射線学的進行の統計

抗CarP抗体陽性とX線写真的進行の関連を前記社会科学用統計パッケージ(SSS)17.0を使用して分析した。0.05未満のP値を統計的に有意とみなした。長軸方向のデータの多変量正規回帰分析を、放射線学的スコアを応答変数として用いて使用した。この方法は、反復測定を即座に分析し、これらの測定間の相関を利用して、より正確な標準誤差をもたらす。放射線学的スコアを対数変換して、正規分布を得た。経時的関節破壊率を、時間と抗CarPの相互作用によって試験した。時間の効果は、相互作用期間において線形であると想定した。時間の効果は、モデルにおける因子としても入力され、経時的平均応答プロファイルを与えた。処理の代理(proxy)として年齢、性別及び算入期間がすべての分析において補正変数として含まれた。別の分析においては、抗CarP抗体の効果は、抗CCP及びRFの効果に対して補正した。

20

【0068】

[実施例1]

結果

抗CarP抗体の検出

本発明者らは、インビトロで生成されたカルバミル化FCSで被覆されたプレートを使用して血清及び滑液から抗CarP抗体を検出する新規ELISAを作成した。本発明者らは、カルバミル化FCS(Ca-FCS)に対してIgGとIgAの両方の用量依存的結合を示し、未変性FCSに対して結合しない陽性血清のプールから標準を作製した(図1A)。ホモシトルリンとシトルリンは極めて類似した残基であるが互いに1原子異なるので、本発明者らは、抗CarP抗体が実際にACPAである可能性を除外したいと思った。これを除外する第1の試験として、本発明者らは、Ca-FCSに結合した抗CarP抗体がCa-FCS自体によってのみ阻害され得るが、シトルリン化FCS(Ci-FCS)、未変性FCSによっても、ACPAを検出するのに使用されるペプチドによっても阻害されず(図1B)、抗CarPが真に異なる反応性であることを示す阻害研究を実施した。ACPAとCCP2プレートの結合もCa-FCSの添加によって阻害されなかった(データ示さず)。

30

40

【0069】

これらの方法はELISAに依拠するので、本発明者らは本発明者らの知見をウエスタンブロット法を使用して確認したいとも思った。本発明者らは、非還元性ゲル上でFCS及びCa-FCSを泳動させ、ウエスタンブロッティング後、ELISAで検出された、抗CarP抗体に対して陽性又は陰性である患者の血清を使用してブロットを染色した。抗CarP抗体陽性患者の血清は、Ca-FCSを載せたレーンで陽性であったが、FCSを載せたレーンでは反応性は見られなかった(図1C)。抗CarP抗体陰性患者由来の血清は、かかる染色を示さなかった。添加されたゲル上のクーマシー染色によって、本

50

発明者らは、FCS添加レーンが類似のタンパク質量を含むことを確認する。まとめると、これらのデータは、本発明者らが、IgGとIgAの両方の抗CarP抗体を特異的に検出することができる新規アッセイを作成したことを示している。

【0070】

抗CarP抗体はRA中に存在する。

ライデン早期関節炎クリニック(EAC)から、本発明者らは、1987年選択基準に従ってUA又はRAに罹患した患者を使用した。さらに、本発明者らは、やはりライデン地域の健康な対照を使用した。本発明者らは、患者と対照における抗CarP抗体の存在を同時に測定した。OD値は、標準を使用して任意の単位/mLに計算された。本発明者らは、健康な人を使用して、健康な対照の平均+2×標準偏差で定義される陽性のカットオフを計算した。本発明者らは、試料がカットオフより高い力価を有し、FCSに比べてCa-FCS上で少なくとも0.1単位高い吸光度を有するときに、試料が陽性であるとみなした[17]。この手法を用いて、本発明者らは、RA患者の42%がIgG抗CarP抗体陽性であるのに対して、試験したRA患者由来の血清の54%がIgA抗CarP抗体陽性であることを確認した(図2)。対になった血清/滑液試料の分析によれば、抗CarP IgG及びIgAは、血清中のこれらの自己抗体に陽性である患者の滑液中にも見ることができる(データ示さず)。

10

【0071】

抗CarP抗体は、かなりの割合のRA患者における血清及び滑液中に存在する。

【0072】

抗CarP抗体は、ACPAとは無関係である。

次に、本発明者らは、抗CarP抗体がACPAとは無関係に生じるかどうか分析したいと思った。このために、本発明者らは、373名のRA患者のセットにおいて、ACPAと抗CarP抗体の関係を分析した。本発明者らのデータによれば、RA患者の14%及び23%はACPAを示さないが、それぞれ抗CarP IgG及びIgAを有する。同様に、RA患者の22%及び19%はACPAに対して陽性であるが、それぞれ抗CarP IgG及びIgAに対して陰性であった(図3)。ACPA陰性個体に注目して、本発明者らは、すべてのACPA陰性RA患者の約50%が抗CarP抗体に対して陽性であることを認めた。したがって、抗CarP抗体は、ACPAとは無関係に生じる。

20

【0073】

抗CarP抗体はRAの発症を予示する。

ベースラインで未分化関節炎の診断を呈する患者は、寛解することがあり、別の形態の関節炎を発症することがあり、又はRAを発症することがある。臨床的に、それは、治療を必要とする患者と自然に寛解する患者を識別できることに関連する。したがって、本発明者らは、ベースラインでUAを有する425名の患者を抗CarP抗体の存在及びRAの発症について分析した(n=151)。本発明者らは、IgG抗CarP抗体に対して陽性であることが1987年基準によるRAの発症と統計学的に有意に関連しないことを認めた(p=0.11)。それに対して、IgA抗CarP抗体は、全体としてUA群における今後のRA発症と強く関連した(p=0.002)(図4)。この効果は、ACPA陰性個体において特に顕著であった(図4)。

30

40

【0074】

未分化関節炎に罹患した患者における抗CarP抗体の測定は、RAを発症するリスクがある人を特定するのに有用である。

【0075】

抗CarP抗体は、より重篤な放射線学的損傷に関連する。

最後に、本発明者らは、ベースラインで抗CarP抗体に対して陽性であるRA患者がその疾患の異なる臨床経過を有するかどうかを分析した。したがって、本発明者らは、関節損傷の程度を経時的に比較した。この分析においても、IgG抗CarP抗体に対して陽性であることは、放射線学的損傷と統計学的に有意に関連しなかった(p=0.43)。しかし、IgA抗CarP抗体は、関節のより重篤な損傷と強く関連し(p=0.00

50

2) (図5)、リウマチ因子(RF)又はACPAとは無関係な効果である。全体として、これらのデータは、抗CarP抗体がRA及び又はACPAの存在とは無関係により重篤な疾患経過と関連することを示している。

【0076】

考察

ここで、カルバミル化タンパク質を認識する自己抗体(抗CarP)の新規ファミリーについて記述する。これらの抗CarP抗体は、IgGとIgAの両方のアイソタイプで検出することができる。阻害研究とコホート研究の両方によれば、抗CarP抗体はACPAとは異なる。興味深いことに、抗CarP、特にIgAに対して陽性であることは、抗CarP IgAに対して陽性の個体はUAからRAに進行するリスクが高く、抗CarP IgA陽性RA患者は抗CarP IgA陰性RA患者よりも悪い成績を有するという臨床的意味を有する。

10

【0077】

本発明者らは、複合タンパク質混合物を初期カルバミル化タンパク質抗原源として使用することに決め、したがって本発明者らはCa-FCSを作製した。本発明者らは、ELISAとウエスタンブロットシステムの両方で未変性FCSにもシトルリン化FCSにも結合しないFCSのカルバミル化体に特異的な抗体が存在することを認めた。これらの抗体は、IgGとIgAの両方のアイソタイプであり、クラス転換されたB細胞に由来することを示し、T細胞の助けを必要とするプロセスである。実際、データは、ホモシトルリンに対するT細胞がカルバミル化モデル抗原を用いた免疫化によって誘導され得ることを示している[11]。

20

【0078】

本発明者らは、ここで、早期関節炎におけるこれらの抗体の検出が、今後のRAの発症を予測でき、より重篤な疾患経過を予測できることを示す。早期の積極的な治療が有益であることが判明したので[18、19]、本発明は、関節炎に罹患した又は罹患するリスクがある個体の関節炎治療方法であって、前記個体の関節炎診断を含み、前記診断が、前記個体の体液を含む試料中の抗CarP抗体を測定する方法を含む、方法を提供する。好ましくは、試料は、抗CarP抗体を含むと判定された。前記抗CarP陽性個体のより厳密な治療は、患者に有益である。

【0079】

要するに、シトルリン化タンパク質を認識する自己抗体系(ACPA)に次いで、カルバミル化タンパク質に対する自己抗体系(抗CarP)も存在する。かかる抗体の検出は、その存在が、ACPAとは無関係に、UAからRAへの進行に関連し、より重篤な疾患経過に関連するので、有用である。

30

【0080】

[実施例2]

結果

抗CarP抗体とACPAは異なる抗体ファミリーである。

カルバミル化タンパク質に対する抗体(抗CarP抗体)を検出するために、本発明者らは、カルバミル化FCS(Ca-FCS)及び非修飾FCSを抗原として用いるELISAを開発した。40名のRA患者及び40名の対照の血清を分析して、本発明者らは、RA患者の血清が、IgG(図7A、B)とIgA(図7C、D)の両方の反応性を有する健康な対象から得られる血清に比べて、Ca-FCSと反応することを認めた。Ca-FCSに対するRA血清の高い反応性は、無修飾FCSに対する反応性を減算後に更に強調される(図7C、E)。シトルリン及びホモシトルリンは、2種類のかなり類似したアミノ酸であるので(図6)、本発明者らは、次に、ACPAが、ペプチド中でシトルリンと同じ位置にあるときのホモシトルリンも認識するかどうか判定したいと思った。この目的のために、本発明者らは、ACPAによって認識されることが知られているシトルリン化Fibペプチドを使用したELISAを実施した(23)。このペプチド骨格内で、シトルリン、アルギニン、ホモシトルリン又はリジン残基が更なる分析のために導入された

40

50

。76個のRA血清のセットを分析して、本発明者らは、ACPAがシトルリン化ペプチドのみを認識し、アルギニン含有又はホモシトルリン含有ペプチドを認識しないことを認めた(図8A)。これらのデータは、ACPAが、同じペプチド骨格内に存在するシトルリンとホモシトルリンを識別できることを示す。次に、本発明者らは、翻訳後修飾タンパク質に結合する抗CarP抗体とACPAの交差反応性があるかどうか分析したいと思った。したがって、本発明者らは、シトルリン化とカルバミル化の両方の抗原に対して反応性である血清を使用して阻害研究を実施した。本発明者らは、Ca-FCS、シトルリン化FCS(Ci-FCS)、未変性FCSと一緒に、又はACPAを検出するのに使用されるシトルリン化ペプチド(CCP1)によって、プレインキュベーション後のCa-FCS被覆プレートに対する抗CarP抗体の結合を分析した。プレインキュベーション後、本発明者らは、Ca-FCSに結合した抗CarP抗体がCa-FCSによってのみ阻害され得るが、シトルリン化FCS(Ci-FCS)、未変性FCSによっても、ACPAを検出するのに使用されるペプチドによっても阻害されないことを認めた(図8B)。本発明者らは、逆阻害実験も実施して、同じプレインキュベーション手順に従ってCi-FCSで被覆されたプレートに対するACPAの結合を分析した。本発明者らは、Ci-FCSに結合したACPAが、Ci-FCS及びシトルリン化ペプチドによってのみ阻害され得るが、Ca-FCSでも、非修飾FCSでも、アルギニン形態のペプチドでも阻害されないことを認めた(図8C)。全体として、これらのデータは、抗CarP抗体とACPAが交差反応性ではなく、又は有限の交差反応性にすぎず、ホモシトルリン、それぞれシトルリン含有抗原に対して特異的であることを示す。上記観察はすべてELISAを使用してなされたので、本発明者らは、異なる技術を使用して本発明者らの知見を確認したいとも思った。このため、本発明者らは、還元ゲル上でFCS、Ca-FCS及びCi-FCSを使用してウエスタンブロット分析を実施し、続いてウエスタンブロット法を実施した。異なるブロットを、抗CarP陽性及びACPA陰性又は抗CarP陰性及びACPA陽性である個体の血清と一緒にインキュベートした。本発明者らは、抗CarP陽性試料の陽性染色をCi-FCSでもFCSでもなくCa-FCSのみで認めた(図8D)。それに対して、抗CarP陰性、ACPA陽性試料は、Ca-FCS及びFCSではなく、Ci-FCSと反応した(図8D)。抗CarP抗体の存在を確認するために、本発明者らは、これらの実験をより明確なタンパク質ヒトFibを標的抗原として使用して繰り返した。Fibは、PADによってシトルリン化され(Ci-Fib)、又はシアナートによってカルバミル化された(Ca-Fib)。非修飾形態(Fib)、Ci-Fib及びCa-FibをELISAにおける抗原として使用した。FCSの観察と同様に、本発明者らは、抗体とCi-Fib及びCa-Fibの有意な結合を認めたが、Fib被覆ウェルでは認められなかった(図9A)。これは、主として、RA血清に限定され、対照には限定されなかった($p < 0.0001$)。交差反応性を分析するために、本発明者らは、上述したように阻害研究も実施した。ELISA分析によって、ACPA及び抗CarP抗体はほぼ非交差反応性であることが確認された。カルバミル化タンパク質に対する反応性が抗体の抗原結合部によって確実に媒介されるようにするために、本発明者らはF(ab')₂を作製した。予想どおりに、F(ab')₂は、陰性試料ではなく抗CarP IgG陽性試料から生成され、抗CarP反応性を示す(図9C、D)。完全抗体を使用して観察されるように、Ca-Fibに対するF(ab')₂反応性もCa-Fibによって特異的に阻害され得るが、Ci-Fibに対するF(ab')₂反応性はCi-Fibによってのみ特異的に阻害され得る(図9E)。

【0081】

まとめると、これらのデータは、抗CarP抗体とACPAが異なる抗原を認識し、一方がシトルリン化タンパク質を認識し(ACPA)、他方がカルバミル化タンパク質を認識する(抗CarP)ことを示す。同様に、これらのデータは、抗原認識が、F(ab')₂断片中に存在する可変ドメインによって媒介される可能性が最も高いことを示す。

【0082】

抗CarP抗体はRA中に存在する。

10

20

30

40

50

ACPAとは別個の自己抗体ファミリーとして抗CarP抗体の同定後、本発明者らは、RA患者及び対照の大集団においてこれらの抗CarP抗体の存在を定量化したいと思った。このため、本発明者らは、まず、抗CarP抗体陽性血清のプールを含む標準を製した。この標準は、IgGとIgAの両方とカルバミル化FC5(Ca-FC5)の特異的用量依存的結合を示したが、無修飾FC5には結合しなかった(図10A、B)。この分析では、本発明者らは、できるだけ多くの抗CarP反応性を捕らえようとしてFC5に基づくアッセイを再度使用した。本発明者らは、方法のセクションに記載のように、305名の健康な個体の血清を使用して陽性のカットオフを設定した。この手法を使用して、本発明者らは、分析されたRA患者の血清の45%がIgG抗CarP抗体に対して陽性であることを認めた(図10C)。同様に、試験されたRA患者の血清の43%はIgA抗CarP抗体に対して陽性である(図10D)。

10

【0083】

抗CarP抗体は、抗CCP2陰性RA患者の血清中にも存在する。

この研究で分析されたRA患者の群は、CCP2アッセイによって測定して、ACPA陽性とACPA陰性の両方の個体からなった。したがって、本発明者らは、次に、抗CarP抗体と抗CCP2抗体の関連性を分析した。抗CarP抗体及び抗CCP2抗体の存在は、RA集団全体を分析したときに限定された相関を示した(抗CarP IgGの場合、 $r^2 = 0.27$ 、 $p < 0.001$ 、又はIgAの場合、 $r^2 = 0.15$ 、 $p < 0.001$)。しかし、本発明者らは、抗CCP2抗体に対してのみ陽性であるかなりの数のRA患者、並びに抗CarP抗体に対してのみ陽性である患者群も特定した(図10E、F)。

本発明者らは、抗CCP2陰性RA患者の約16%が抗CarP IgG抗体を示し、抗CCP2陰性RA患者の30%が抗CarP IgA陽性を示すことを認めた(図10G、H)。これらのデータは、抗CarP抗体の存在が抗CCP2抗体の出現率と重なるが、30%を超える抗CCP2陰性患者が抗CarP抗体を有するので、この重なりは絶対的なものではないことを示している。全体では、全抗CCP2陰性患者の35%超が抗CarP IgG又はIgA抗体を有する。

20

【0084】

抗CarP抗体は、より重篤な放射線学的損傷に関連する。

ACPAの存在は、放射線学的損傷によって測定して、より重篤な臨床的疾患経過に関連する。抗CarP抗体の存在がより重篤な疾患経過も予測するかどうか分析するために、本発明者らは、ライデンEACコホートに参加した抗CarP陽性と陰性患者の経時的関節損傷度を比較した。このコホートは、関節炎を最近発症した患者の初期コホートであり、手足のX線がすべてのRA患者で毎年撮影されて、シャープ-ファンデルハイデ法によって放射線学的損傷が評価される(24)。本発明者らは、抗CarP IgGの存在がより重篤な疾患進行と強く関連することを認めた。抗CarP IgG陽性患者は、IgG陰性患者よりも7年間にわたって関節破壊が多く、ACPA及びRFの補正なしで($\beta = 2.01$ 、95%CI 1.68~2.40、 $p = 8.68 \times 10^{-14}$)又は補正ありで($\beta = 1.41$ 、95%CI 1.13~1.76、 $p = 0.002$)である(図13)。

抗CarP IgAは、ACPA及びRFの補正なしで($\beta = 1.21$ 、95%CI 1.01~1.45、 $p = 0.041$)抗CarP IgA陰性患者よりも7年間にわたりより多くの関節破壊に関連するが、補正後は関連がない($p = 0.855$) (図13)。上記分析は、抗CarP抗体が抗CCP2陰性、抗CCP2陽性又は両方のRAサブグループにおいて放射線学的進行を予測するかどうか示さないため、本発明者らは、次に、層別解析を実施した。重要なことには、この解析によって、抗CarP IgGの存在が抗CCP2陰性サブグループにおいてより重篤な関節損傷に関連することが判明した($\beta = 1.86$ 、95%CI 1.41~2.66、 $p = 1.8 \cdot 10^{-5}$) (図11)。

同様に、より多くの経時的関節損傷に対する類似の傾向が、IgA抗CarP抗体に対して陽性を示した抗CCP2陰性患者でも認められた($\beta = 1.25$ 、95%CI 0.98~1.58、 $p = 0.071$) (図13)。それに対して、重篤な関節破壊によって既に特徴づけられた抗CCP2陽性サブグループにおいては、更なる増加は抗Ca

30

40

50

r P抗体も有する個体において認められなかった(図13)。全体として、これらのデータは、ベースラインにおける抗CarP抗体の検出が、シャープ/ファンデルハイデ法によって測定して、抗CCP2陰性RAにおけるより破壊的な疾患経過を予示することを示している。

【0085】

考察

カルバミル化タンパク質を認識する自己抗体である抗CarP抗体のファミリーは、RA患者の血清中に検出することができる。阻害研究とコホート研究の両方によれば、抗CarP抗体とACPAは、2つの異なる独立した自己抗体ファミリーであり、一方はカルバミル化タンパク質を認識し、他方はシトルリン化タンパク質を認識する。本発明者らのデータによれば、抗CarP抗体とACPAは、概して非交差反応性ではあるが、カルバミル化タンパク質接種後のウサギにおいて得られた最近のデータでも示されるように、本発明者らは、幾らかの交差反応性が集団レベルで存在することを排除しない(14)。興味深いことに、抗CarP抗体陽性は、抗CarP IgG陽性個体としての臨床成績に関係するが、抗CCP2抗体陰性は、抗CarP IgG陰性RA患者に比べてより破壊的な疾患経過を有する。

【0086】

現在、カルバミル化のような翻訳後修飾を起こすタンパク質は不明である。カルバミル化は、尿素と平衡にあるシアナートによって媒介される。高い尿素濃度、喫煙及び炎症は、この平衡をシアナート側にシフトさせ、したがってカルバミル化を促進することが報告された(13)。現在、抗CarP抗体に生体内に関連する標的は不明であるので、本発明者らは、抗CarP抗体の検出のための初期カルバミル化タンパク質抗原源として複合タンパク質混合物を使用した。ウエスタンブロット分析は、(高尿素濃度を表す)シアナートを使用したカルバミル化後のFCS中に存在する少なくとも1種類の主要なタンパク質の抗CarP抗体による認識を示す(図8D)。しかし、これらのデータは、カルバミル化がより漸進的ではあるが常に生じているプロセスである生体内の状況を表していない可能性がある(25)。この点に関して、カルバミル化はほぼ不可逆的であり、したがって半減期の長いタンパク質上にホモシトルリン残基が蓄積するので、特に長寿命のタンパク質は、次第にホモシトルリン残基を得る可能性がある。興味深いことに、関節は、コラーゲン、他の軟骨で発現されるタンパク質などの長寿命タンパク質の存在が知られている。したがって、かかる基質タンパク質は、生存中に、特に炎症条件下で、ホモシトルリン残基を蓄積すると考えられる。実際、ホモシトルリンは関節に存在することが判明し(11)、恐らくは多数の関節由来のタンパク質の長寿命の性質を示す。これらのタンパク質の識別情報、及びこれらが抗CarP抗体の標的として役立つかどうかを知ることは興味深い。

【0087】

ACPAによって認識される抗原の分子的性質は、15年以上前に確認され、シトルリンは、これらのRA特異抗体によって認識される抗原の必須成分であると記述された(26、27)。この知見は、関連する新たな洞察をRA診断及び病因論に与える道筋をつけたので、かなりの衝撃を与えた(1)。例えば、ACPAは、現在、RAの新しいACR/EULAR基準の一部であり(28)、動物モデル(29、30、31)と生体外ヒト研究(32、33、34、35)の両方においてRA病原に関係している。重要なことには、ACPAの記述は、多数の臨床的特徴を共有するが、遺伝的背景、素因になるような環境要因、及び臨床的進行/寛解に関して異なる少なくとも2つの臨床症候群をRAが構成するという認識をもたらした(36、3、4、37、38)。確固たる結論を出すには尚早であることは明白であるが、認識された抗原の類似の性質、及びACPA陰性疾患におけるその存在を考慮に入れると、抗CarP抗体も病因の一因になり、及び/又は診断上の価値を有すると推測したくなる。

【0088】

抗CCP2陰性疾患における抗CarP抗体の存在は、潜在的にRAのこの徴候の少な

10

20

30

40

50

くとも一部を積極的に確認する新規バイオマーカーであり得るので極めて興味深い。この可能性の更なる洞察を得るために、抗C a r P抗体の存在がR Aに特異的であるかどうか、又は別のリウマチ性疾患においても見られるかどうか、並びにその存在が早期の未分類R A及び/又は関節痛などの関節疾患に罹患した患者における(A C P A陰性) R Aの発症を予測するかどうか確かめることは重要である。

【0089】

陽性試料を規定するカットオフを設定するために、本発明者らは、健康な対照の血清におけるC a - F C S及びF C Sに対するI g G及びI g Aの存在を分析した。全試料のC a - F C S及びF C Sに対する反応性を試験して、同じプレート上に存在する抗C a r P抗体陽性標準を使用して吸光度値をa U / m Lに変換した。幾つかの個体対象由来の血清は非修飾F C Sに対しても反応性を示したので、本発明者らは、検量線によって定義されたa U / m Lを使用して、C a - F C Sに対する反応性から「F C S反応性」を減算した。本発明者らは、続いて、カットオフを平均+ 2 x 標準偏差として計算し、類似の戦略に従ってR A患者のデータにカットオフを適用した。この方法の欠点は、別の抗原性実体であるF C Sに対するa U / m Lを測定するために標準をC a - F C Sに対して使用することである。しかし、この方法は、翻訳後修飾に対する特異的応答の計算を可能にした。

10

【0090】

カットオフを設定するどの方法も利点と限界を有する。したがって、本発明者らは、続いて、カットオフを対照における抗C a - F C S応答の平均+ 2 x 標準偏差として計算することによって、別の戦略も使用して本発明者らの観察を確認した。このカットオフを、以前にも使用されたように、R A患者のデータに適用した(39)。A C P A陰性R AにおけるI g Gの放射線学的進行との関連は、低有意水準(p = 0 . 0 0 1)ではあるが、依然有意である。

20

【0091】

臨床的観点からは、早期関節炎における抗C a r P抗体の検出は、より重篤な疾患経過を予測するので、極めて価値のある可能性がある。早期の積極的なR A治療は今後の損傷を防止することが判明したので(40、41)、抗C a r P抗体の検出は、重篤な疾患を発症するリスクのある抗C C P 2陰性患者を特定するのに有益かもしれない。かかる患者の特定は、特に分類が困難である早期関節炎患者において、発症後早期の治療法決定を導くのに重要かもしれない。

30

【0092】

要するに、シトルリン化タンパク質を認識する自己抗体系(A C P A)に加えて、カルバミル化タンパク質に対する自己抗体系(抗C a r P)もR A患者の血清中に存在する。抗C a r P抗体の検出は、重篤な疾患経過のリスクがある患者を特定する新しい可能性を提供することができる。

【0093】

参考文献

- 1 クラレスコグ(K l a r e s k o g) L , ロネリド(R o n n e l i d) J , ランドバーグ(L u n d b e r g) K , パデュコフ(P a d y u k o v) L , アルフレッドソン(A l f r e d s s o n) L . リウマチ様関節炎におけるシトルリン化タンパク質に対する免疫(I m m u n i t y t o c i t r u l l i n a t e d p r o t e i n s i n r h e u m a t o i d a r t h r i t i s .) アニュアル レビュー オブ イミ ュノロジー(A n n u R e v I m m u n o l) 2 0 0 8 ; 2 6 : 6 5 1 - 7 5 .
- 2 カルバーグ(K a l l b e r g) H , パデュコフ(P a d y u k o v) L , プレンゲ(P l e n g e) R M , ロネリド(R o n n e l i d) J , グレガーセン(G r e g e r s e n) P K , ファン デル ヘルム - バン ミル(v a n d e r H e l m - v a n M i l) A H 他 リウマチ様関節炎の2つのサブセットにおけるH L A - D R B 1、P T P N 2 2 及び喫煙を含む遺伝子 - 遺伝子及び遺伝子 - 環境相互作用(G e n e - g e n e a n d g e n e - e n v i r o n m e n t i n t e r a c t i o n s i n v o l v i n g H L A - D R B 1 , P T P N 2 2 , a n d s m o k i n g i n t w o

40

50

subsets of rheumatoid arthritis). アメリカン
ジャーナル オブ ヒューマン ジェネティクス (Am J Hum Genet) 20
07; 80 (5): 867 - 75 .

3 ファン デル ヘルム - バン ミル (van der Helm - van Mil)
AH, フェアプルト (Verpoort) KN, ブリードベルド (Breedveld)
) FC, トウズ (Toes) RE, ホイジンガ (Huizinga) TW. シトルリン化
タンパク質に対する抗体、及びリウマチ様関節炎の臨床的進行における相違 (Antib
odies to citrullinated proteins and diffe
rences in clinical progression of rheum
atoid arthritis). アースリシス リサーチ アンド セラピー (Ar
thritis Res Ther) 2005; 7 (5): R949 - R958 .

10

4 ファン デル ウーデ (van der Woude) D., ヤング (Young)
A, ジャヤクマル (Jayakumar) K, メルテンス (Mertens) BJ, トウ
ズ (Toes) RE, ファン デル (van der) HD 他 持続性疾患の罹患率及び
予測因子 - リウマチ様関節炎における抗リウマチ薬を使用しない寛解の改善: 2つの大き
い早期関節炎コホートの結果 (Prevalence of and predicti
ve factors for sustained disease - modify
ing antirheumatic drug - free remission in
rheumatoid arthritis: results from two l
arge early arthritis cohorts). アースリシス アンド
リウマチズム (Arthritis Rheum) 2009; 60 (8): 2262 -
71 .

20

5 ヴィセル (Visser) K, フェアプルト (Verpoort) KN, ファン (
van) DH, ファン デル クーイジ (van der Kooij) SM, アラート
(Allaart) CF, トウズ (Toes) RE 他、抗環式シトルリン化ペプチド抗体
の治療前血清レベルは、最近発症した関節炎におけるメトトレキサートに対する応答に関
連する (Pretreatment serum levels of anti - cy
clic citrullinated peptide antibodies ar
e associated with the response to methot
rexate in recent - onset arthritis). アナルズ オ
ブ ザ リウマチック ディジーズ (Ann Rheum Dis) 2008; 67 (8
) : 1194 - 5 .

30

6 コヘン (Cohen) SB, エメリー (Emery) P, グリーンワルド (Gree
nwald) MW, ドウガドス (Dougados) M, フリエ (Furie) RA, ジ
ェノベセ (Genovese) MC 他 抗腫瘍壊死因子療法に不応性のリウマチ様関節
炎用リツキシマブ: 24週における主要有効性及び安全性を評価する多中心無作為二重盲
検プラセボ対照第三相試験の結果 (Rituximab for rheumatoid
arthritis refractory to anti - tumor necr
osis factor therapy: Results of a multic
enter, randomized, double - blind, placebo
- controlled, phase III trial evaluating
primary efficacy and safety at twenty - fo
ur weeks). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rh
eum) 2006; 54 (9): 2793 - 806 .

40

7 クアルツシオ (Quartuccio) L, ファブリス (Fabris) M, サルビ
ン (Salvin) S, アツェニ (Atzeni) F, サラコ (Saracco) M, ベ
ヌシ (Benucci) M 他 抗CCP陽性ではなくリウマチ因子陽性、より低い能力障
害及びより少ない不合格抗TNF剤は、リウマチ様関節炎におけるリツキシマブに対する
応答に関連する (Rheumatoid factor positivity rat
her than anti - CCP positivity, a lower di

50

sability and a lower number of anti-TNF agents failed are associated with response to rituximab in rheumatoid arthritis). リウマトロジー オックスフォード (Rheumatology Oxford) 2009; 48(12): 1557-9.

8 ジョージ (Gyorgy) B, トス (Toth) E, タルクサ (Tarcsa) E, ファルス (Falus) A, ブザス (Buzas) EI. シトルリン化: 健康及び疾患における翻訳後修飾 (CitruLLination: a posttranslational modification in health and disease). インタナショナル ジャーナル オブ バイオケミストリ アンド セル バイオロジ (Int J Biochem Cell Biol) 2006; 38(10): 1662-77.

10

9 ワン (Wang) Y, ウィソツカ (Wysocka) J, サイグ (Sayegh) J, リー (Lee) YH, ペリン (Perlin) JR, レオネリ (Leonelli) L 他 ヒト PAD4 は、脱メチルイミノ化によってヒストンアルギニンメチル化レベルを調節する (Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminatiOn). サイエンス (Science) 2004; 306(5694): 279-83.

10 リー (Li) P, リー (Li) M, リンドベルグ (Lindberg) MR, ケネット (Kennett) MJ, シュン (Xiong) N, ワン (Wang) Y. PAD4 は、好中球細胞外トラップによって媒介される抗菌性自然免疫に不可欠である (PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps). ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン (J Exp Med) 2010; 207(9): 1853-62.

20

11 ミデル (Mydel) P, ワン (Wang) Z, ブリスラート (Brisler) M, ヘルバード (Hellvard) A, ダルバーグ (Dahlberg) LE, ハゼン (Hazen) SL 他 T細胞のカルバミル化依存活性化: 自己免疫性関節炎の病原における新規機序 (Carbamylation-dependent activation of T cells: a novel mechanism in the pathogenesis of autoimmune arthritis). ジャーナル オブ イミュノロジ (J Immunol) 2010; 184(12): 6882-90.

30

12 シルパル (Sirpal) S. アテローム硬化型血管疾患の機構経路としてのミエロペルオキシダーゼ媒介性リポタンパク質カルバミル化 (Myeloperoxidase-mediated lipoprotein carbamylation as a mechanistic pathway for atherosclerotic vascular disease). クリニカル サイエンス (Clin Sci) (ロンドン) 2009; 116(9): 681-95.

13 ワン (Wang) Z, ニコルス (Nicholls) SJ, ロドリゲス (Rodriguez) ER, クム (Kummu) O, ホルコ (Horkko) S, バーナード (Bernard) J 他 タンパク質カルバミル化は、炎症、喫煙、尿毒及びアテローム発生を関連させる (Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis). ネイチャー メディシン (Nat Med) 2007; 13(10): 1176-84.

40

14 ツルネン (Turunen) S, コイブラ (Koivula) MK, リステリ (Risteli) L, リステリ (Risteli) J. 抗シトルリン抗体は、ウサギにおけるホモシトルリン含有タンパク質に起因し得る (AnticitruLLine antibodies can be caused by homocitruLLine

50

- containing proteins in rabbits). アースリシス
 アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 2010; 62(11): 3
 345 - 52 .
- 15 ファン アクネン (van Aken) J., ファン ビルセン (van Bil
 sen) JH, アラート (Allaart) CF, フイジンガ (Huizinga) TW
 , ブリードベルド (Breedveld) FC. ライデン早期関節炎クリニック (The
 Leiden Early Arthritis Clinic). クリニカル アン
 ド エクスペリメンタル リューマトロジー (Clin Exp Rheumatol)
 2003; 21(5 Suppl 31): S100 - S105 .
- 16 アーネット (Arnett) FC, エドワーシー (Edworthy) SM, プロ 10
 ッホ (Bloch) DA, マクシェン (McShane) DJ, フリーズ (Fries)
 JF, クーパー (Cooper) NS 他 米国リウマチ学会1987年リウマチ様関節炎
 分類改訂基準 (The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classif
 ication of rheumatoid arthritis). アースリシス
 アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 1988; 31(3): 31
 5 - 24 .
- 17 フェアプルト (Verpoort) KN, チェウン (Cheung) K, イオア 20
 ン-ファシネイ (Ioan-Facsinay) A, ファン デル ヘルム-バン ミル
 (van der Helm-van Mil) AH, デ ブリース-ボウストラ (de
 Vries-Bouwstra) JK, アラート (Allaart) CF 他 抗シトル
 リン化タンパク質抗体応答の繊細な特異性は、共有エピトープ対立遺伝子によって影響さ
 れる (Fine specificity of the anti-citrullin
 ated protein antibody response is influ
 enced by the shared epitope alleles). アース
 リシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 2007; 56(1
 2): 3949 - 52 .
- 18 ファン デル ヘルム-バン ミル (van der Helm-van Mil 30
) AH, レ (le) CS, ファン (van) DH, ブリードベルド (Breedveld
) FC, トウズ (Toes) RE, ホイジンガ (Huizinga) TW、最近発症した
 未分化関節炎の患者における疾患結果の予測基準：個体治療法決定指針 (A predi
 ction rule for disease outcome in patien
 ts with recent-onset undifferentiated ar
 thritis: how to guide individual treatme
 nt decisions). アースリシス アンド リウマチズム (Arthriti
 s Rheum) 2007; 56(2): 433 - 40 .
- 19 ファン ドンジェン (van Dongen) H, ファン アクネン (van A 40
 ken) J, ラード (Lard) LR, ヴィセル (Visser) K, ロンデイ (Ron
 day) HK, ハルスマンス (Hulsmans) HM 他 推定リウマチ様関節炎患者に
 おけるメトトレキサート治療の有効性：二重盲検無作為化プラセボ対照試験 (Effic
 acy of methotrexate treatment in patient
 s with probable rheumatoid arthritis: a
 double-blind, randomized, placebo-contro
 lled trial). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis
 Rheum) 2007; 56(5): 1424 - 32 .
23. ウイレムゼ (Willemze) A 他 (2011) HLA 共有エピトープ対立遺伝 50
 子と喫煙の相互作用、及び幾つかのシトルリン化抗原に対する自己免疫へのその寄与 (T
 he interaction between HLA shared epitop
 e alleles and smoking and its contributi
 on to autoimmunity against several citru

- llinated antigens). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 63:1823-1832.
24. ファン デル リンデン (van der Linden) MP 他 (2009) CD40 における単一ヌクレオチド多形とリウマチ様関節炎における関節破壊速度の関連性 (Association of a single-nucleotide polymorphism in CD40 with the rate of joint destruction in rheumatoid arthritis). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 60:2242-2247.
25. ベルリン (Berlyne) GM (1998) 健康及び尿毒症におけるカルバミル化タンパク質及びペプチド (Carbamylated proteins and peptides in health and in uremia). ネフロン (Nephron) 79:125-130. 10
26. マッソン - ベシエール (Masson-Bessiere) C 他 (2001) リウマチ様関節炎特異的抗フィラグリン自己抗体の主要滑液標的は、フィブリンのアルファ及びベータ鎖の脱イミノ化形態である (The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin). ジャーナル オブ イミュノロジー (J Immunol) 166:4177-4184. 20
27. シェレケンス (Schellekens) GA 他 (1998) シトルリンは、リウマチ様関節炎特異的自己抗体によって認識される抗原決定基の必須成分である (Citruiline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies). ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲイション (J Clin Invest) 101:273-281.
28. アレタハ (Aletaha) D 他 (2010) リウマチ様関節炎の2010米国リウマチ学会/リウマチに対するヨーロッパ連盟分類基準 (The 2010 American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis and Rheumatism) 30
29. ヒル (Hill) JA 他 (2008) DR4-IEトランスジェニックマウスにおける翻訳後修飾 (シトルリン化) フィブリンノーゲンによって誘発される関節炎 (Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice). ザ ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン (The Journal of Experimental Medicine) 205:967-979. 40
30. クーン (Kuhn) KA 他 (2006) シトルリン化タンパク質に対する抗体は、実験的自己免疫性関節炎において組織傷害を増強する (Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis). ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲイション (J Clin Invest) 116:961-973.
31. ウイサル (Uysal) H 他 (2009) 実験的関節炎におけるシトルリン化コーゲンタイプIIに特異的な抗体の構造及び病原性 (Structure and pathogenicity of antibodies specific for c 50

itrullinated collagen type II in experimental arthritis). ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン (J Exp Med)

32. クラベル (Clavel) C 他 (2008) フィブリノーゲンと複合化されたシトルリン化タンパク質に対するリウマチ様関節炎特異的自己抗体によるFcγ受容体IIaの結合を介した腫瘍壊死因子アルファのマクロファージ分泌の誘導 (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). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 58: 678-688.

10

33. ルー (Lu) MC 他 (2010) 抗シトルリン化タンパク質抗体は、単球/マクロファージ上の表面発現シトルリン化Grp78に結合し、腫瘍壊死因子アルファ産生を刺激する (Anti-citrullinated protein antibodies bind surface-expressed citrullinated Grp78 on monocyte/macrophages and stimulate tumor necrosis factor alpha production). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 62: 1213-1223.

20

34. シュエルウエー (Schuerwegh) AJM 他 (2010) リウマチ様関節炎におけるIgE抗シトルリン化タンパク質抗体の機能的役割の証拠 (Evidence for a functional role of IgE anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis). 米国科学アカデミー予稿集 (Proceedings of the National Academy of Sciences) 107: 2586-2591.

35. トロウ (Trouw) LA 他 (2009) リウマチ様関節炎患者由来の抗環式シトルリン化ペプチド抗体は、古典的経路と別経路の両方によって補体を活性化する (Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 60: 1923-1931.

30

36. リン-ラスカー (Linn-Rasker) SP 他 (2006) 喫煙は、HLA-DRB1共有エピトープ対立遺伝子を有するリウマチ様関節炎患者においてのみ抗CCP抗体の危険因子である (Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles). アナルズ オブ ザ リウマチック ディジーズ (Ann Rheum Dis) 65: 366-371.

40

37. ファン ガーレン (van Gaalen) FA 他 (2004) HLAクラスII遺伝子と環式シトルリン化ペプチド (CCP) に対する自己抗体の関連性は、リウマチ様関節炎の重症度に影響を及ぼす (Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 50: 2113-2121.

50

38. フェアプルト (Verpoort) KN他 (2005) HLA-DR3 と抗環式シトルリン化ペプチド抗体陰性リウマチ様関節炎の関連性 (Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 52: 3058-3062.
39. フェアプルト (Verpoort) KN他 (2007) 抗シトルリン化タンパク質抗体応答の繊細な特異性は、共有エピトープ対立遺伝子によって影響される (Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 56: 3949-3952. 10
40. ファン デル ヘルム-バン ミル (van der Helm-van Mil) AH他 (2007) 最近発症した未分化関節炎の患者における疾患結果の予測基準: 個体治療法決定指針 (A prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: how to guide individual treatment decisions). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 56: 433-440.
41. ファン ドンジェン (van Dongen) H他 (2007) 推定リウマチ様関節炎患者におけるメトトレキサート治療の有効性: 二重盲検無作為化プラセボ対照試験 (Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 56: 1424-1432. 20
42. デ ルーイ (de Rooy) DPC他 (2011) 関節炎結果を予測する GCo ライデン早期関節炎クリニックから何を学ぶことができるか? (Predicting arthritis outcomes GCoewhat can be learned from the Leiden Early Arthritis Clinic?). リウマトロジー (Rheumatology) 50: 93-100. 30
43. アーネット (Arnett) FC他 (1988) 米国リウマチ学会 1987 年リウマチ様関節炎分類改訂基準 (The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis Rheum) 31: 315-324.
44. スワンナライ (Suwannalai) P他 (2011) 抗シトルリン化タンパク質抗体は、リコール抗原に対する抗体よりも低い結合活性を有する (Anti-citrullinated protein antibodies have a low avidity compared with antibodies against recall antigens). アナルズ オブ ザ リウマチック ディゼーズ (Annals of the Rheumatic Diseases) 70: 373-379. 40
45. フェアプルト (Verpoort) KN他 (2007) 抗シトルリン化タンパク質抗体応答の繊細な特異性は、共有エピトープ対立遺伝子によって影響される (Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles). アースリシス アンド リウマチズム (Arthritis and Rheumatism) 56: 3949 50

- 3952 .

46 . シェレケンス (S c h e l l e k e n s) G A 他 (1 9 9 8) シトルリンは、リウマチ様関節炎特異的自己抗体によって認識される抗原決定基の必須成分である (C i t r u l l i n e i s a n e s s e n t i a l c o n s t i t u e n t o f a n t i g e n i c d e t e r m i n a n t s r e c o g n i z e d b y r h e u m a t o i d a r t h r i t i s - s p e c i f i c a u t o a n t i b o d i e s) . ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲイション (J C l i n I n v e s t) 1 0 1 : 2 7 3 - 2 8 1 .

47 . ファン デル ハイデ (v a n d e r H e i j d e) D (2 0 0 0) シャープ / ファン デル ハイデ法による X 線像の読み取り方 (H o w t o r e a d r a d i o g r a p h s a c c o r d i n g t o t h e S h a r p / v a n d e r H e i j d e m e t h o d) . ジャーナル オブ リウマトロジー (J o u r n a l o f R h e u m a t o l o g y) 2 7 : 2 6 1 - 2 6 3 .

10

【 0 0 9 4 】

[表 1]

表 I フィブリノーゲンアルファのリジン含有ペプチド及びそのホモシトルリン含有対応物のリスト

フィブリノーゲンアルファのリジン フィブリノーゲンアルファのホモシトルリン含有ペプチド
含有ペプチド

20

1RVVERHQSACKDSDWPFCSD	1RVVERHQSAChomocitDSDWPFCSD
2PFCSDDEDWNYKCPSGCRMKGL	2PFCSDDEDWNYhomocitCPSGCRMhomocitGL
3NYKCPSGCRMKGLIDEVNQDF	3NYhomocitCPSGCRMhomocitGLIDEVNQDF
4VNQDFTNRINKLKNSLFEYQK	4VNQDFTNRINhomocitLhomocitNSLFEYQhomocit
5QDFTNRINKLKNSLFEYQKNN	5QDFTNRINhomocitLhomocitNSLFEYQhomocitNN
6KLKNSLFEYQKNNKDSHSLTT	6homocitLhomocitNSLFEYQhomocitNNhomocitDSHSLTT
7NSLFEYQKNNKDSHSLTTNIM	7NSLFEYQhomocitNNhomocitDSHSLTTNIM
8EDLRSR IEVLKRKVI EKVQHI	8EDLRSR IEVLhomocitRhomocitVIEhomocitVQHI
9LRSR IEVLKRKVI EKVQHIQL	9LRSR IEVLhomocitRhomocitVIEhomocitVQHIQL
10IEVLKRKVI EKVQHIQLLQKN	10IEVLhomocitRhomocitVIEhomocitVQHIQLLQhomocitN
11EKVQHIQLLQKNVRAQLVDMK	11EhomocitVQHIQLLQhomocitNVRAQLVDMhomocit
12KNVRAQLVDMKRLEVDIDIKI	12homocitNVRAQLVDMhomocitRLEVDIDIhomocitI
13MKRLEVDIDIKIRSCRGSCSR	13MhomocitRLEVDIDIhomocitIRSCRGSCSR
14SRALAREVDLKDYEQQKQLE	14SRALAREVDLhomocitDYEDQQhomocitQLE
15VDLKDYEQQKQLEQVIAKDL	15VDLhomocitDYEDQQhomocitQLEQVIAhomocitDL
16QQKQLEQVIAKDLLPSRDRQH	16QQhomocitQLEQVIAhomocitDLLPSRDRQH
17SRDRQHLPLIKMKPVPDLVPG	17SRDRQHLPLIhomocitMhomocitPVPDLVPG
18DRQHLPLIKMKPVPDLVPGNF	18DRQHLPLIhomocitMhomocitPVPDLVPGNF
19PVPDLVPGNFKSQKQVPPEW	19PVPDLVPGNFhomocitSQLQhomocitVPPEW
20VPGNFKSQKQVPPEWKALTD	20VPGNFhomocitSQLQhomocitVPPEWhomocitALTD
21SQLQKVPPEWKALTDMPQMRM	21SQLQhomocitVPPEWhomocitALTDMPQMRM
22SSGTGGTATWKPSSGPGSTG	22SSGTGGTATWhomocitPGSSGPGSTG
23PGTRREYHTEKLVTSKGDKEL	23PGTRREYHTEhomocitLVTShomocitGDhomocitEL
24EYHTEKLVTSKGDKELRTGKE	24EYHTEhomocitLVTShomocitGDhomocitELRTGhomocitE
25TEKLVTSKGDKELRTGKEKVT	25TEhomocitLVTShomocitGDhomocitELRTGhomocitEhomocitVT
26SKGDKELRTGKEKVTSGSTTT	26ShomocitGDhomocitELRTGhomocitEhomocitVTSGSTTT
27GDKELRTGKEKVTSGSTTTTR	27GDhomocitELRTGhomocitEhomocitVTSGSTTTTR
28STTTTRRSCSKVTKTIVIGPD	28STTTTRRSCShomocitTVThomocitTVIGPD
29TRRSCSKVTKTIVIGPDGHKE	29TRRSCShomocitTVThomocitTVIGPDGHhomocitE
30TKTIVIGPDGHKEVTKVVTSE	30ThomocitTVIGPDGHhomocitEVThomocitEVVTSE

30

40

50

31IGPDGHKEVTKEVVTSEDGSD	31IGPDGHhomocitEVThomocitEVTSEDGSD
32AAFFDTASTGKTFFGFFSPML	32AAFFDTASTGhomocitTFPGFFSPML
33GSESGIFTNTESSSHHPGIA	33GSESGIFTNThomocitESSSHHPGIA
34PGIAEFPSRGKSSSYKQFTS	34PGIAEFPSRGhomocitSSSYShomocitQFTS
35PSRGKSSSYKQFTSSTSYNR	35PSRGhomocitSSSYShomocitQFTSSTSYNR
36YNRGDSTFESKSYKMADEAGS	36YNRGDSTFEShomocitSYhomocitMADEAGS
37GDSTFESKSYKMADEAGSEAD	37GDSTFEShomocitSYhomocitMADEAGSEAD
38EADHEGTHSTKRGHAKSRPVR	38EADHEGTHSThomocitRGHAhomocitSRPVR
39GTHSTKRGHAKSRPVRDCDDV	39GTHSThomocitRGHAhomocitSRPVRDCDDV
40SGTQSGIFNIKLPGSSKIFSV	40SGTQSGIFNIhomocitLPGSShomocitIFSV
41IFNIKLPGSSKIFSVYCDQET	41IFNIhomocitLPGSShomocitIFSVYCDQET
42LNFNRTWQDYKRGFGLNDEG	42LNFNRTWQDYhomocitRGFGLNDEG
43VRGIHTSPLGKPSLSP	43VRGIHTSPLGhomocitPSLSP

10

【 0 0 9 5 】

[表 2]

表 I I フィブリノーゲンベータのリジン含有ペプチド及びそのホモシトルリン含有対応物のリスト

フィブリノーゲンベータのリジン含有 フィブリノーゲンベータのホモシトルリン含有ペプチド

20

1MKRMVSWSFHKL	1MhomocitRMVSWSFHhomocitL
2MKRMVSWSFHKLKTMKHL	2MhomocitRMVSWSFHhomocitLhomocitTMhomocitHL
3RMVSWSFHKLKTMKHL	3RMVSWSFHhomocitLhomocitTMhomocitHL
4SWSFHKLKTMKHL	4SWSFHhomocitLhomocitTMhomocitHL
5LLLLLCVFLVKSQGVNDNEEG	5LLLLLCVFLVhomocitSQGVNDNEEG
6FSARGHRPLDKKREEAPSLRP	6FSARGHRPLDhomocithomocitREEAPSLRP
7SARGHRPLDKKREEAPSLRPA	7SARGHRPLDhomocithomocitREEAPSLRPA
8SGGGYRARPAAKAATQKKVER	8SGGGYRARPAAhomocitAAATQhomocithomocitVER
9ARPAKAATQKKVERKAPDAG	9ARPAhomocitAAATQhomocithomocitVERhomocitAPDAG
10RPAKAATQKKVERKAPDAGG	10RPAhomocitAAATQhomocithomocitVERhomocitAPDAGG
11AAATQKKVERKAPDAGGCLHA	11AAATQhomocithomocitVERhomocitAPDAGGCLHA
12SSSFQYMYLLKDLWQKRQKQV	12SSSFQYMYLLhomocitDLWQhomocitRQhomocitQV
13YMYLLKDLWQKRQKQVKNEN	13YMYLLhomocitDLWQhomocitRQhomocitQVhomocitDNEN
14LLKDLWQKRQKQVKNENVVN	14LLhomocitDLWQhomocitRQhomocitQVhomocitDNENVVN
15DLWQKRQKQVKNENVVNEYS	15DLWQhomocitRQhomocitQVhomocitDNENVVNEYS
20PVVSCEEIIRKGGETSEMYLI	20PVVSCEEIIRhomocitGGETSEMYLI
21MYLIQPDSSVKPYRVYCDMNT	21MYLIQPDSSVhomocitPYRVYCDMNT
22VDFGRKWDVPYKQGFNVATNT	22VDFGRhomocitWDPYhomocitQGFNVATNT
23FGNVATNTDGKNYCGLPGEYW	23FGNVATNTDghomocitNYCGLPGEYW
24LPGEYWLGNDKISQLTRMGPT	24LPGEYWLGNdhomocitISQLTRMGPT
25TELLIEMEDWKGDKVKAHYGG	25TELLIEMEDWhomocitGDhomocitVhomocitAHYGG
26L IEMEDWKGDKVKAHYGGFTV	26L IEMEDWhomocitGDhomocitVhomocitAHYGGFTV
27EMEDWKGDKVKAHYGGFTVQN	27EMEDWhomocitGDhomocitVhomocitAHYGGFTVQN
28GGFTVQNEANKYQISVNKYRG	28GGFTVQNEANhomocitYQISVNhomocitYRG
29EANKYQISVNKYRGTAGNALM	29EANhomocitYQISVNhomocitYRGTAGNALM
30NDGWLTS DPRKQCSKEDGGGW	30NDGWLTS DPRhomocitQCShomocitEDGGGW
31LTS DPRKQCSKEDGGGWYNR	31LTS DPRhomocitQCShomocitEDGGGWYNR
32WGGQYTWDMAKHGTDDGVVWM	32WGGQYTWDMAhomocitHGTDDGVVWM
33TDDGVVWMNWKGSWYSMRKMS	33TDDGVVWMNWhomocitGSWYSMRhomocitMS
34NWKGSWYSMRKMSMIRPFFQ	34NWhomocitGSWYSMRhomocitMSMhomocitIRPFFQ

30

40

50

35SWYSMRKMSMKIRPFFPQQ

35SWYSMRhomocitMSMhomocitIRPFFPQQ

【 0 0 9 6 】

[表 3]

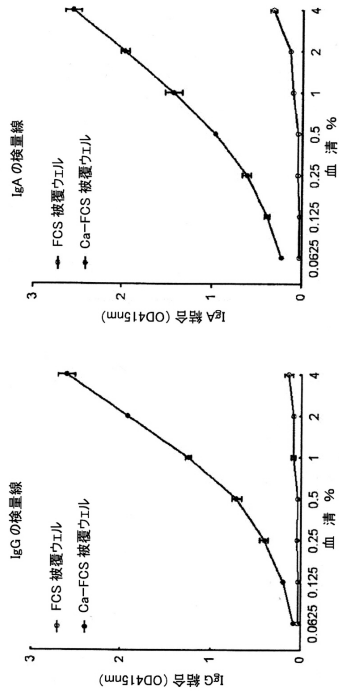
表 I I I フィブリノーゲンガンマのリジン含有ペプチド及びそのホモシトルリン含有
対応物のリスト

フィブリノーゲンガンマのリジン含有フィブリノーゲンガンマのホモシトルリン含有ペ
チド

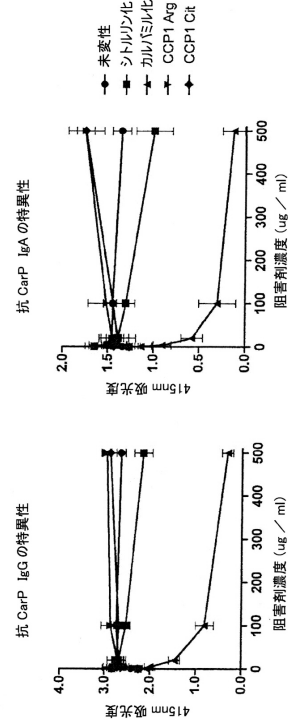
ペプチド

1 IADFLSTYQTKVDKDLQSLED	1 IADFLSTYQThomocitVDhomocitDLQSLED	
2 FLSTYQTKVDKDLQSLEDILH	2 FLSTYQThomocitVDhomocitDLQSLEDILH	10
3 LEDILHQVENKTSEVKQLIKA	3 LEDILHQVENhomocitTSEVhomocitQLIhomocitA	
4 HQVENKTSEVKQLIKAIQLTY	4 HQVENhomocitTSEVhomocitQLIhomocitAIQLTY	
5 NKTSEVKQLIKAIQLTYNPDE	5 NhomocitTSEVhomocitQLIhomocitAIQLTYNPDE	
6 QLTYNPDESSKPNMIDAATLK	6 QLTYNPDESShomocitPNMIDAATLhomocit	
7 KPNMIDAATLKSRKMLEEIMK	7 homocitPNMIDAATLhomocitSRhomocitMLEEIMhomocit	
8 MIDAATLKSRKMLEEIMKYEA	8 MIDAATLhomocitSRhomocitMLEEIMhomocitYEA	
9 KSRKMLEEIMKYEASILTHDS	9 homocitSRhomocitMLEEIMhomocitYEASILTHDS	
10 LQEIYNSNNQKIVNLKEKVAQ	10 LQEIYNSNNQhomocitIVNLhomocitEhomocitVAQ	
11 NSNNQKIVNLKEKVAQLEAQC	11 NSNNQhomocitIVNLhomocitEhomocitVAQLEAQC	
12 NNQKIVNLKEKVAQLEAQCQE	12 NNQhomocitIVNLhomocitEhomocitVAQLEAQCQE	20
13 QLEAQCQEPCDITVQIHDITG	13 QLEAQCQEPCChomocitDITVQIHDITG	
14 DITVQIHDITGKDCQDIANKGA	14 DITVQIHDITGhomocitDCQDIANhomocitGA	
15 TGKDCQDIANKGAKQSGLYFI	15 TGhomocitDCQDIANhomocitGAhomocitQSGLYFI	
16 DCQDIANKGAKQSGLYFIKPL	16 DCQDIANhomocitGAhomocitQSGLYFIhomocitPL	
17 GAKQSGLYFIKPLKANQQFLV	17 GAhomocitQSGLYFIhomocitPLhomocitANQQFLV	
18 GSGNGWTVFQKRLDGSVDFKK	18 GSGNGWTVFQhomocitRLDGSVDFhomocithomocit	
19 QKRLDGSVDFKKNWIQYKEGF	19 QhomocitRLDGSVDFhomocithomocitNWIQYhomocitEGF	
20 KRLDGSVDFKKNWIQYKEGFG	20 homocitRLDGSVDFhomocithomocitNWIQYhomocitEGFG	
21 VDFKKNWIQYKEGFGHLSPTG	21 VDFhomocithomocitNWIQYhomocitEGFGHLSPTG	
22 GTTEFWLGNEKIHLISTQSAI	22 GTTEFWLGNEhomocitIHLISTQSAI	30
23 RTSTADYAMFKVGPEADKYRL	23 RTSTADYAMFhomocitVGPEADhomocitYRL	
24 AMFKVGPEADKYRLTYAYFAG	24 AMFhomocitVGPEADhomocitYRLTYAYFAG	
25 GFDGDDPSDKFFTSHNGMQF	25 GFDGDDPSDhomocitFFTSHNGMQF	
26 QFSTWDNDNDKFEQNCAEQDG	26 QFSTWDNDNDhomocitFEQNCAEQDG	
27 EQDGSWWWMNKCHAGHLNGVY	27 EQDGSWWWNhomocitCHAGHLNGVY	
28 GVYYQGGTYSKASTPNGYDNG	28 GVYYQGGTYShomocitASTPNGYDNG	
29 YDNGI I WATWKTRWYSMKKTT	29 YDNGI I WATWhomocitTRWYSMhomocithomocitTT	
30 ATWKTRWYSMKKTTMKI I PFN	30 ATWhomocitTRWYSMhomocithomocitTTMhomocitI I PFN	
31 TWKTRWYSMKKTTMKI I PFNR	31 TWhomocitTRWYSMhomocithomocitTTMhomocitI I PFNR	
32 RWYSMKKTTMKI I PFNRLTIG	32 RWYSMhomocithomocitTTMhomocitI I PFNRLTIG	40

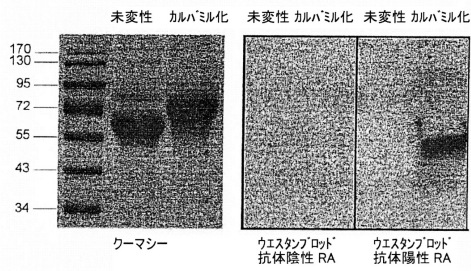
【図 1 A】



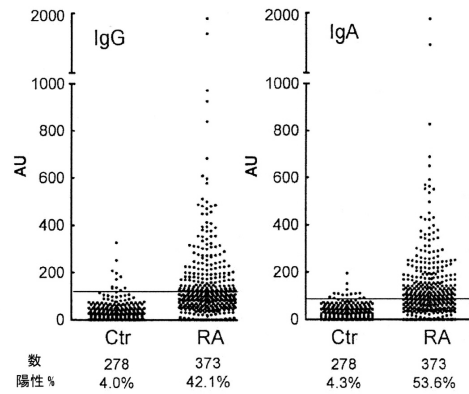
【図 1 B】



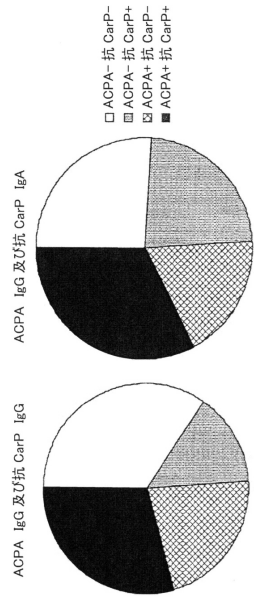
【図 1 C】



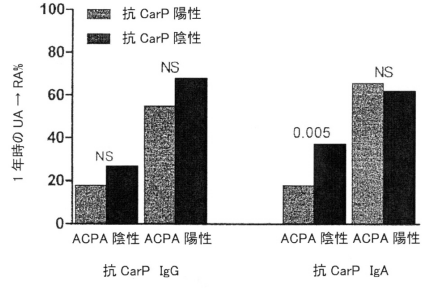
【図 2】



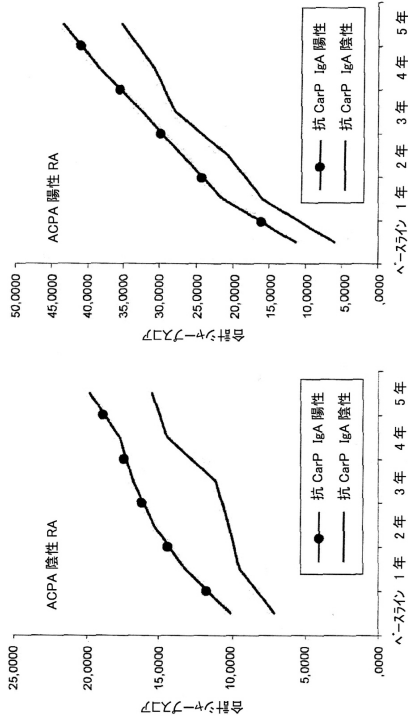
【 図 3 】



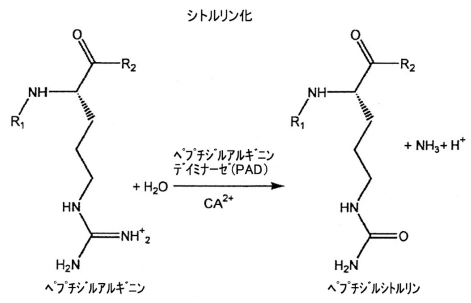
【 図 4 】



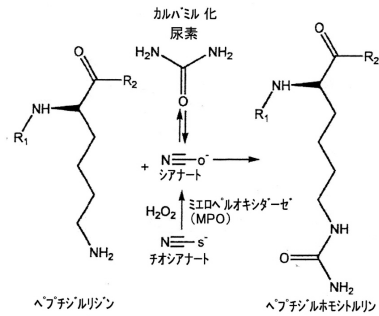
【 図 5 】



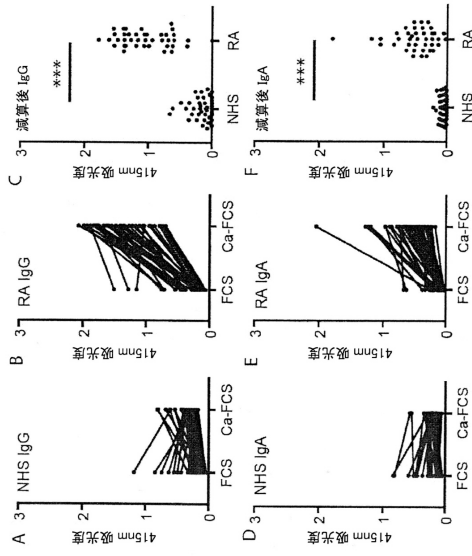
【 図 6 A 】



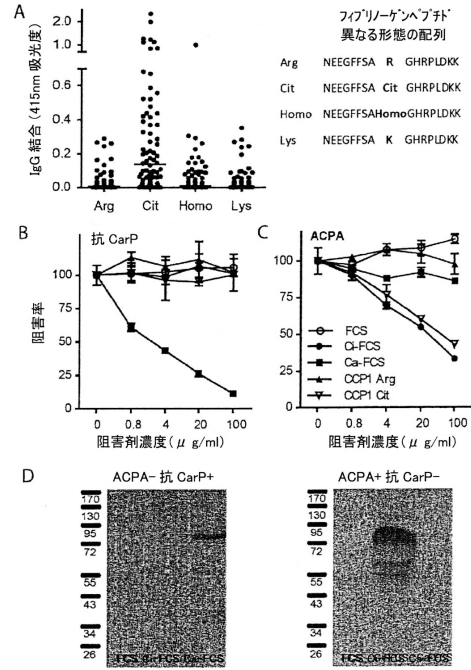
【 図 6 B 】



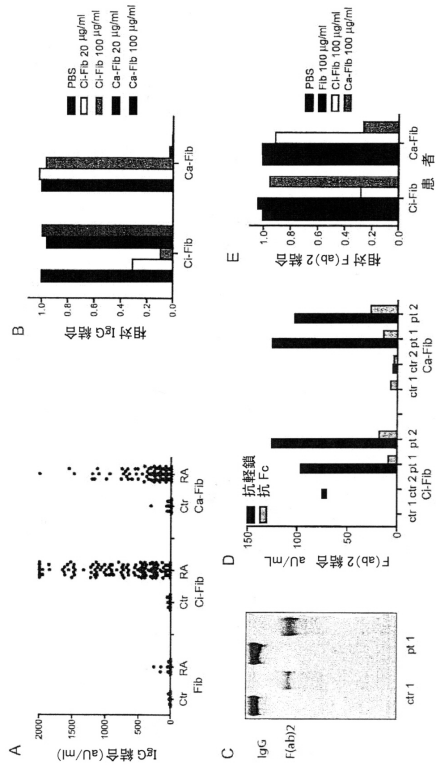
【図7】



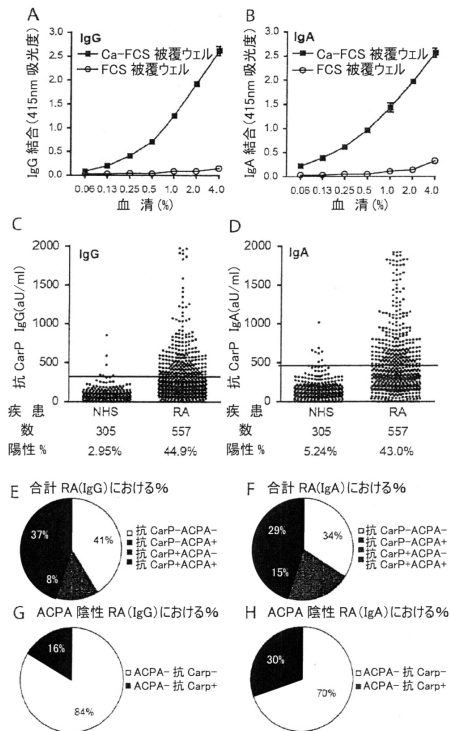
【図8】



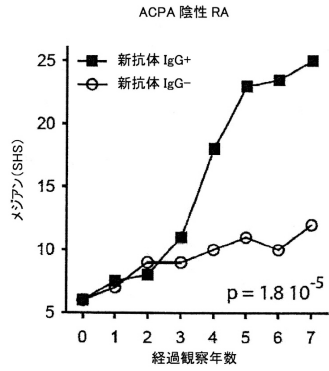
【図9】



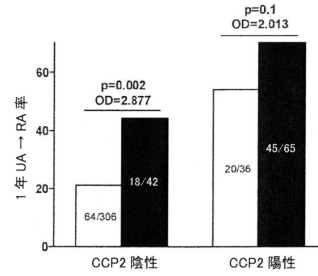
【図10】



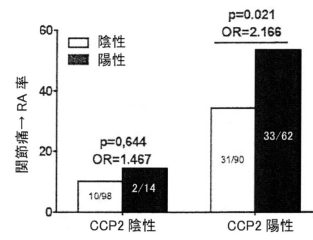
【図 1 1】



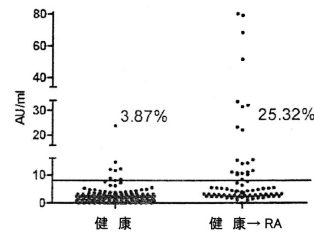
【図 1 2 A】



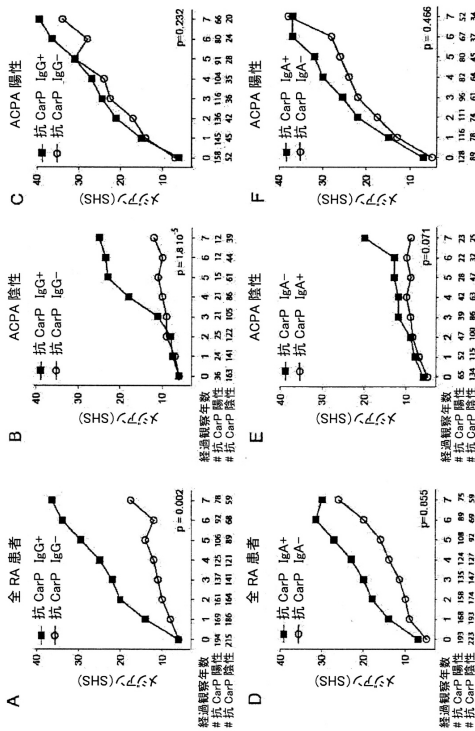
【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



【図 1 3】



【図 1 4】

アブリンゲンアルファの氨基酸配列

10	20	30	40	50	60
MFSMRAIVCLIV	LSVVGTAHTA	DSGEDFLAE	GGVVRGRVY	ERHOSACKDS	DWPFCSDEIW
70	80	90	100	110	120
NYKCPSGCRM	KGLIDEVQD	FTNRINKLN	SLFEYQKNK	DSHSLTINIM	EILRGDFSSA
130	140	150	160	170	180
NNRDNTYNRV	SEDLRSRIEV	LKRKVIKQV	HIQLLQKVR	AQLVDMKLE	VDIDIKIRSC
190	200	210	220	230	240
RGSCSRALAR	EVDLKDIEDQ	QKQLQVIK	DLLPSDRQH	LPLIRMKFVP	DLVPGNFKSQ
250	260	270	280	290	300
LQKVPPWKA	LTDMPQMRME	LERPGGNEIT	RGGSTSYGTG	SETESPNNFS	SAGSWNSGSS
310	320	330	340	350	360
GGSTGNRNP	GSSGTGGTAT	WPKGSSGPGS	TGSWNSGSSG	TGSTGNWPG	SPRPGSTGIV
370	380	390	400	410	420
NGSSSERGA	GHWTESSVS	GSTGQWSES	GSFRPDSPGS	GNARNPNPDW	GTFEVSGNV
430	440	450	460	470	480
SPGTRREYHT	EKLVTSGDK	ELRATGKEVT	SGSTTTTRS	CSKTKVTVI	GPDGHEKIVK
490	500	510	520	530	540
EVVTSEDSGD	CPEAMDGLT	SGIGTLDGFR	HRHPDEAAPP	DTASTGKTFP	GFFSFMLGEF
550	560	570	580	590	600
VSETESRSGE	SGIFTNKES	SSHPGLAEF	PSRGSSSYS	KQFTSSSYIN	RGDSTFEKKS
610	620	630	640	650	660
YKMADEAGSE	ADHEGTHSTK	RHAKSRFVR	DCDDVLQTHP	SGTQSGIFNI	KLFGSSKIFS
670	680	690	700	710	720
VIYCDQETSLG	GWLLIQKMD	GSLNFRKIQ	DYKRGFGLN	DEGESEFWLG	NDVHLLITQR
730	740	750	760	770	780
GSLRVELED	WAGNEAYEY	HFRVGSSEAG	VALQVSSYEG	TAGDALIEGS	VEGAEYTSH
790	800	810	820	830	840
NNMQFSTFDR	DADQWEENCA	EVYGGWYIN	NCQANLNGI	YYPGGSYDPR	NNSPFEIENG
850	860				
VWVSPRGAD	YSLRAVRMKI	RPIIVTQ			

【 図 1 5 】

フィブリンゲノヘターのアミノ酸配列

```

10      20      30      40      50      60
MKRMVSWSFH KLKTMKHLIL LLLCVPLVKS QGVNDNEEGF FSARGHRPLD KKREAEPSLR
70      80      90     100     110     120
PAPPPISGGG YRARPAAKAA TQKKVERKAP DAGGCLHADP DLGVLCPTGC QLOEALLQOE
130     140     150     160     170     180
RPIRNSVDEL NNNVEAVSQT SSSSFQMYL LKDLWQKROK QVKDNEVVN EYSSELEKHQ
190     200     210     220     230     240
LYIDETWNSN IPTNLRVLR LLENLRSKIQ KLESIVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVS
250     260     270     280     290     300
CEELIRKGGE TSEMYLIQPD SSVKPYRVYC DMNTENGGWT VIQNRQDGSV DFGRKWDPPYK
310     320     330     340     350     360
QGFGNVATNF DGRNYCGLPG EYWLGNDKLS QLTRMGPTLE LIEMEDWAGD KVKAHYGGFT
370     380     390     400     410     420
VQNEANKYQI SVNHYRGTAG NALMDGASQL MGENRITMTH NGMFFSTYDR DNDGWLTSDP
430     440     450     460     470     480
RKQCSKEDGG GWWYNRCHAA NPNGRYYWGG QYTWDMAKHG TDDGVVVRANW KGSWYSMRKM
490
SMKIRPFFFPQ Q

```

【 図 1 6 】

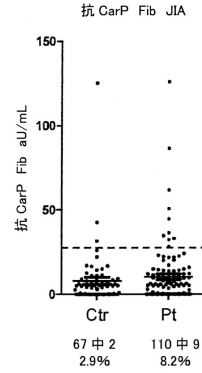
フィブリンゲノガマのアミノ酸配列

```

10      20      30      40      50      60
MSWSLHPRNL ILYFYALLFL SSTCVAVVAT RDNCCLLDER FGSYCPTCG IADFLSTYQF
70      80      90     100     110     120
KVDKDLQSLD DILHGVENKT SEVKQLKAI QLTYNPDESS KPNMIDAATL KSRKMLEEIM
130     140     150     160     170     180
KYEASILTHD SSIRYIQEY NSNNQKIVNL KEKVAQLERQ CQEPCKDTVQ IHDITGKDCQ
190     200     210     220     230     240
DIANKGAKQS GLYFIFLFA NQFLVJCEI DGSGNWTVE QKRLDGSVDF KRWIQYKES
250     260     270     280     290     300
FGHLSPTGTT EFWLGNKIKH LISTQSAIPY ALRVELEDWN GRSTADYAM FXVGPEDAKY
310     320     330     340     350     360
RLTYVAFGG DAGDAFDGPD FGDDPSDKFF TSHNGQFST WDNDNDKFEK NCAEQDGSQW
370     380     390     400     410     420
WANKHAGHL NGVYQGGTY SKASTPQYD NGIIVATWKT RWYSMSKTTM KIIPFNRLTI
430     440     450
GEGQQHLLGG AKQVAREHPA ETEYDSLYPE DDL

```

【 図 1 7 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ホイジンハ, トマス ヴィレム ヨハンネス
オランダ国 2333 ゼットアー レイデン アルビヌスドレーフ 2内
- (72)発明者 ファン フェーレン, ペトルス アントニウス
オランダ国 2333 ゼットアー レイデン アルビヌスドレーフ 2内
- (72)発明者 セラミ, アントニー
オランダ国 2333 ゼットアー レイデン アルビヌスドレーフ 2内

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 国際公開第2009/032722(WO, A1)
米国特許出願公開第2008/0318872(US, A1)
特開平10-227793(JP, A)
特許第2638682(JP, B2)
特表2007-520713(JP, A)
米国特許出願公開第2011/0014632(US, A1)
特表2012-514184(JP, A)
国際公開第2009/007846(WO, A2)
MYDEL PIOTR, CARBAMYLATION-DEPENDENT ACTIVATION OF T CELLS: A NOVEL MECHANISM IN THE PATHOGENESIS OF AUTOIMMUNE ARTHRITIS, JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 2010年6月, V184 N12, P6882-6890
ANGEL Peggi M, Quantitative carbamylation as a stable isotopic labeling method for comparative proteomics, Rapid Commun Mass Spectrom, 2007年, Vol.21 No.10, Page.1623-1634
SHI Jing, Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage, Proc Natl Acad Sci USA, 2011年10月18日, Vol.108 No.42, Page.17372-17377
黒川真奈絵, リウマチ・膠原病と翻訳後修飾異常, 臨床リウマチ, 2015年, Vol.27 No.4, Page.313-317
大田俊行, 関節リウマチにおける抗シトルリン化ペプチド抗体測定の有用性, モダンメディア, 2007年, 53巻8号, Page.208-212
Stephane Jaisson, Carbamylation-Derived Products: Bioactive Compounds and Potential Biomarkers in Chronic Renal Failure and Atherosclerosis, Clinical Chemistry, 2011年7月18日, Vol.57 No.11, Page.1499-1505
STEINBRECHER U P, Immunogenicity of homologous low density lipoprotein after methylation, ethylation, or carbamylation: Generation of antibodies for specific for derivatized lysine, J Lipid Research, 1984年, Vol.25 No.10, Page.1109-1116

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53
C07K 14/75
G01N 33/564
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	抗氨基甲酰化蛋白抗体和关节炎的风险		
公开(公告)号	JP6154748B2	公开(公告)日	2017-06-28
申请号	JP2013552484	申请日	2012-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	奥斯卡扫描ZEE Kenhai雪橇书斋她的香水在连接埃尔谷厨吮说		
申请(专利权)人(译)	Akademisu ZEE肯海特莱顿辛苦哦，天，颜.Eryuemuse		
当前申请(专利权)人(译)	Akademisu ZEE肯海特莱顿辛苦哦，天，颜.Eryuemuse		
[标]发明人	トラウレーンデルトアドリアヌス トウスレイナルドゥスエフェラルドゥスマリア ホイジンハトマスヴィレムヨハンネス ファンフェーレンペトルスアントニウス セラミアントニー		
发明人	トラウ,レーンデルト アドリアヌス トウス,レイナルドゥス エフェラルドゥス マリア ホイジンハ,トマス ヴィレム ヨハンネス ファン フェーレン,ペトルス アントニウス セラミ,アントニー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/564 C07K14/75		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/6854 G01N2800/101 G01N2800/102 G01N2800/104 G01N2800/105 G01N2800/107 Y02A50/57 G01N2333/75 G01N2440/00 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/564.B G01N33/53.X C07K14/75.ZNA		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2011153046 2011-02-02 EP 2011182399 2011-09-22 EP		
其他公开文献	JP2014505884A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 针对瓜氨酸化蛋白抗原 (ACPA) 的抗体已显示其与关节炎的诊断和可能的发病机理相关。本发明提供了用于测定针对含有高瓜氨酸蛋白的蛋白质或氨基甲酰化蛋白质/肽 (抗Car P) 的抗体的方法和方法，用于分类患有或有患关节炎风险的个体。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6154748号 (P6154748)
(45) 発行日 平成29年6月28日 (2017. 6. 28)	(24) 登録日 平成29年6月9日 (2017. 6. 9)	
(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/564 (2006. 01)	GO 1 N 33/564	B
CO 7 K 14/75 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	X
	CO 7 K 14/75	ZNA
請求項の数 20 (全 40 頁)		
(21) 出願番号 特願2013-552484 (P2013-552484)	(73) 特許権者 511181533 アカデミス ズィーケンハイ ス レイデン ハー、オー、ゲー、エン、エルユーエムセー オランダ国 2 3 3 3 セットアー レイデン アルビヌストレーフ 2	
(86) (22) 出願日 平成24年2月1日 (2012. 2. 1)	(74) 代理人 特許業務法人 武和国際特許事務所	
(65) 公表番号 特表2014-505884 (P2014-505884A)	(72) 発明者 トラウ、レーンデルト アドリアヌス オランダ国 2 3 3 3 セットアー レイデン アルビヌストレーフ 2内	
(43) 公表日 平成26年3月6日 (2014. 3. 6)	(72) 発明者 トウス、レイナルドゥス エフェラルドゥスマリア オランダ国 2 3 3 3 セットアー レイデン アルビヌストレーフ 2内	
(86) 国際出願番号 PCT/NL2012/050056		
(87) 国際公開番号 W02012/105838		
(87) 国際公開日 平成24年8月9日 (2012. 8. 9)		
審査請求日 平成26年12月16日 (2014. 12. 16)		
(31) 優先権主張番号 11153046. 5		
(32) 優先日 平成23年2月2日 (2011. 2. 2)		
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号 11182399. 3		
(32) 優先日 平成23年9月22日 (2011. 9. 22)		
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 抗カルバミル化タンパク質抗体及び関連炎リスク

最終頁に続く