

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-279378

(P2010-279378A)

(43) 公開日 平成22年12月16日(2010.12.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	

審査請求 有 請求項の数 6 O L 外国語出願 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-167334 (P2010-167334)	(71) 出願人	506119165 ユニフェルジテイト・マーストリヒト
(22) 出願日	平成22年7月26日 (2010.7.26)		UNIVERSITEIT MAASTRICHT
(62) 分割の表示	特願2006-530040 (P2006-530040) の分割		オランダ、エヌエル-6200エムデー・マーストリヒト、ユニフェルジテイツシングル50番
原出願日	平成16年9月27日 (2004.9.27)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	03078161.1	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成15年10月9日 (2003.10.9)	(74) 代理人	100156122 弁理士 佐藤 剛
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100106231 弁理士 矢野 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ガレクチン-3 またはトロンボスポンジン-2 のレベルを定量することによって心不全を発症する危険性がある対象を同定する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 鬱血性心不全のごとき高血圧性終末器官損傷を発症する危険性のある対象を同定する方法の提供。

【解決手段】 高血圧性終末器官損傷を発症する危険性がある患者の末梢血漿試料について、非筋細胞マーカーであるガレクチン-3 またはトロンボスポンジン-2 のレベルを、mRNA または蛋白レベルで測定する方法。また、該疾患の予防・治療用医薬の製造のための、ガレクチン-3 またはトロンボスポンジン-2 の使用。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 高血圧性終末器官損傷を発症する危険性がある対象の生体試料を採取し、
(b) 該試料中の少なくとも 1 つの非筋細胞マーカーのレベルを定量し、ここに、該非筋細胞マーカーはガレクチン - 3 およびトロンボスポンジン - 2 よりなる群から選択され
;
(c) 該マーカーのレベルを標準のレベルと比較し、次いで、
(d) 該マーカーのレベルが高血圧性終末器官損傷を発症する危険性を示すか否かを決定する;
ことを特徴とする、高血圧性終末器官損傷の危険がある対象を同定する方法。

10

【請求項 2】

該生体試料が末梢血液に由来する血漿試料である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

マーカーのレベルが酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) によって測定される請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

高血圧性終末器官損傷を発症する危険性がある対象を同定するための 1 以上の非筋細胞マーカーの使用であって、該非筋細胞マーカーはガレクチン - 3 およびトロンボスポンジン - 2 よりなる群から選択される使用。

【請求項 5】

鬱血性心不全および高血圧性終末器官損傷の予防およびまたは治療用の医薬の製造のためのガレクチン - 3 の使用。

20

【請求項 6】

鬱血性心不全および高血圧性終末器官損傷の予防およびまたは治療用の医薬の製造のためのトロンボスポンジン - 2 の使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、鬱血性心不全のごとき高血圧性終末器官損傷を発症する危険性のある対象を同定する方法に関する。

30

【背景技術】**【0002】**

鬱血性心不全 (heart failure; HF) は一般的であるが、特に、高齢者において、重篤かつ複雑な臨床症例であり、低下した心収縮機能および減少した運動耐性で特徴付けられ、しばしば心臓血管致死に至る患者の漸進的衰退をもたらす。かくして、大勢の患者が、診断後 1 から 5 年以内に死亡している。しかしながら、深刻な人数の患者が生命を脅かす合併症の発症まで進行しているのに、他の者は長期間安定している。

【0003】

心不全のごとき高血圧性終末器官損傷を発症する危険にある患者の早期同定は急性進行を防止するかもしれないので、心不全を発症しそうな患者を、それが発症する前に、同定することが可能であることが好ましい。また、心不全に罹患し、重篤な合併症を発症する危険にある患者を同定することができることが好ましい。

40

【0004】

現行の方法は、心不全を信頼性よく排除するが、心不全の存在を信頼性よく証明することや、すでに発症した心不全の成り行きを予想することもできず、あるいは、高価な機器および特訓された人を必要とする。

【0005】

それゆえ、心不全が開始する可能性を予想し、すでに発症した心不全の成り行きを予想するための単純かつ信頼性のある方法に対する要求が存在する。

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】**【0006】**

本発明の目的は、心不全のごとき終末器官損傷を発症する特別な危険にあるか、または、心不全の合併症を発症する特別な危険にある患者を同定できる方法を提供することにある。同定後、それらの患者は、例えば、心不全またはその合併症が発症する前に処置することができ、それは臨床的に非常に重要である。

【0007】

これは、高血圧性終末器官損傷を発症する危険にある対象を同定する方法を提供する本発明により達成され、その方法は、以下の：

- (a) 対象の生体試料を採取し；
- (b) 該試料中の少なくとも1の非筋細胞マーカーのレベルを定量し；
- (c) 該マーカーのレベルを標準レベルと比較し；
- (d) 該マーカーのレベルが高血圧性終末器官損傷を発症する危険を示すか否かを決定するステップを含む。

【0008】

本発明にいたる調査において、肥大した心臓が不全となりそうであることを予想するのに用いることができる特定のマーカーが同定された。

【0009】

高血圧症が心臓肥大を引き起こし、それが心不全の最も重大な危険因子であることは一般的に知られている。しかしながら、全ての肥大心臓が最終的に不全となるわけではない。これらの観察は、代償された心肥大から不全にいたる進行の間に、肥大を引き起こすメカニズムに加えて、さらなるメカニズムが参画していることを示唆する。最近の研究は、心肥大に内在する多くの分子または細胞変化を報告するが [Lorell BH et al., *Circulation* 102: 470-479, 2000; Panidis et al., *J Am Coll Cardiol*. 3: 1309-1320, 1984]、心不全に寄与するさらなる因子が今でも依然として不明のまま残されている。

【0010】

Boluytらは、例えば、心不全の自発性高血圧ラット (spontaneously hypertensive rat; SHR) において細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) 成分をコードする遺伝子のアップレギュレーションを立証した [Boluyt et al., *Casrdiovasc Res*. 46: 2399-249, 2000; *Hypertension* 30: 1362-1368, 1997; *Cardiovasc Res*. 30: 836-840, 1995; *Eur Heart J*. 16 suppl. N: 19-30, 1995]。しかしながら、これらの遺伝子の過剰発現が心不全の顕在的な臨床的症状に先行していたのかどうか、また、それらの過剰発現がすでに発症した能動的不全の過程の結果であったのかどうかは明らかではない。

【0011】

いくつかの他のバイアスされていない手法も採用され、心不全に特異的なメカニズムが同定されている [Korstin S et al., *Circ Res*. 92: 715-724, 2003; Hein S et al., *Circulation* 107: 984-991, 2003]。

【0012】

しかしながら、これらの以前の研究は、しばしば、最終段階かつ薬物治療した心筋と正常心筋とを比較する。それゆえ、得られた差異は、不全およびその治療に対して二次的なものであり、その研究は、代償された肥大心臓の不全をもたらす、危険にある患者を同定するためのマーカーとして用いることができる因子を同定しない。

【課題を解決するための手段】**【0013】**

本発明にいたる調査において、不全となりつつある肥大心臓由来の多数の遺伝子の遺伝子発現プロファイルが代償されている肥大心臓と比較された。かくして、遺伝子は、不全となりつつある肥大心臓対代償されたものとで、異なって発現された。特に、本発明は、特定の非心筋遺伝子が疾患心臓組織において異常発現されるという発見に基づく (実施例1および2)。

【0014】

本発明によれば、非心筋性マーカーを使用する。すなわち、心筋以外の細胞由来のマーカーである。これは、本発明の方法が、ストレスを受けた心筋において生じる既知の心筋変化の他のプロセスを「プローブ」という利点を有する。これは、心不全を診断のみならず、既知の心不全の患者を連続的にモニターする、すなわち、主たる不利なイベントを告知するであろう不利な非心筋プロセス（例えば、炎症、瘢痕等）が生じるかどうかをモニターする機会も開く。

【0015】

本発明の方法によれば、生体試料を個々の患者から採取する。引き続き、その試料中の1以上のマーカーのレベルをよく知られた方法で測定する。典型的に、そのレベルを標準レベルと比較して、そのマーカーのレベルがその個人が心不全に進行する可能性を示すかどうかを決定する。この標準レベルは、健康な対象におけるそのマーカーのレベルに基づく。そのマーカーのレベルが標準レベルよりも上昇していれば、その対象はCFHを発症するかまたは心不全の合併症を発症する危険にある。

10

【0016】

生体試料は、血液、血漿、血清、尿等のごとき体液、または、心臓バイオプシーのごとき組織試料のいずれかの試料である。しかしながら、本発明の好ましい具体例によれば、生体試料は末梢血由来の血漿試料である。末梢血試料は患者から簡単に採取でき、カテーテル法のごとき複雑な非侵襲性手順も必要ない。生体試料は、よく知られた技術に準じてプロセスされて試験用試料が調製される。

【0017】

本発明の好ましい具体例によれば、マーカーは蛋白質である。蛋白質のレベルは、当該蛋白質に対する特異的抗体を用いる免疫学的方法のごとき単純かつ信頼性ある方法によって容易に定量できる。

20

【0018】

好ましくは、蛋白質は、ガレクチン-3である。ガレクチン-3のレベルは不全しそうな心臓において早期かつ特異的に発現されることが立証されているからである。

【0019】

本発明のもう1つの好ましい具体例において、蛋白質はトロンボスポンジン-2である。TSP2の増大した心臓発現が、明らかな心不全に進行しそうな肥大心臓を同定することが立証されている。

30

【0020】

それらのマーカーのレベルはいずれかのよく知られた適当な方法によって定量することができる。好ましくは、マーカーのレベルは、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)によって測定し、かくして、単純で、再現性があり、かつ、信頼性のある方法を提供する。

【0021】

本発明は、さらに、鬱血性心不全のごとき高血圧性終末器官損傷を発症する危険にある対象を同定するための1以上の非心筋マーカーの使用に関する。いくつかの非心筋マーカーを本発明により用いる。好ましくは、マーカーは、ガレクチン-3および/またはトロンボスポンジン-2である。

【0022】

本発明により同定されたマーカーは、さらに、本発明、および/または高血圧性終末器官損傷の治療、特に鬱血性心不全の予防および/または治療に用いることができる。例えば、ガレクチン-3の例えば抗体による阻害、および/または、TSP-2の適当なモジュレーターによる活性化が、心不全の発生を防ぐのに有益であろう。それゆえ、本発明は、さらに、高血圧性終末器官損傷の予防および/または治療用の医薬の製造のためのガレクチン-3および/またはそのモジュレーターの使用に関する。本発明は、さらに、高血圧性終末器官損傷の予防および/または治療用の医薬の製造のためのトロンボスポンジン-2の使用に関する。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

50

【図1】図1は、以前報告された統計的プロトコルの実行およびデータマイニングのための包括的カットオフのステップを示すフローチャートである。

【図2】図2は、10週齢のラットから採取した心筋バイオプシーにおける4つの選択した遺伝子のmRNA転写物の発現を定量するリアルタイムPCRの結果を示す。(a) TSP2は、17週間の実験期間中代償されたままのラットと比較して、後に急性心臓代償不全になるラットにおいて著しく過剰発現されている。(b) オステオアクチビン発現である。(c) コラーゲンVI発現である。(d) 脳内ナトリウム排泄増加ペプチドの発現レベルである。これらのデータは、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。Comp、代償；Decom、代償不全。*、 $p < 0.01$ 代償対代償不全群；#、 $p < 0.05$ SD対Ren-2ラット；各群 $n = 4$ 。

10

【図3】図3は、心筋梗塞の誘発後のマウスの生存率を示す。術後、TSP-2不存在マウス(点線)は72時間以内に全て死亡した。手術直後の死亡を除けば、野生型マウス(実線)では死亡は観察されなかった($n = 22$)。

【図4】図4は、第0日およびMI48時間後の心筋コラーゲン含有量の濃度分析の結果を示す棒グラフである(1切片あたり10箇所の無作為視野)。TSP-2不存在マウスは、野生型マウスと比較して、MI48時間後、反応性線維症形成の増加がなかった。*、 $p < 0.01$ 、Mi48時間後の野生型対不存在型株；野生型マウスにおける第0日目対MI48時間後。

【図5】図5は、心筋梗塞を起こした左心室壁の写真および電子顕微鏡像を示す。血管周辺の無傷のマトリックスを示すヘマトキシリン(Haematoxyline)/エオシン(Eosin)染色切片であり、野生型マウスでは間質性出血の証拠はない(a)。TSP-2マウスにおける、広範囲にわたる組織破壊と出血(*) (b)。心筋梗塞を起こした左心室壁(野生型株)の電子顕微鏡像(c)。かなり良好に維持された血管およびマトリックス構造に注目。TSP-2不存在マウスからの切片は間質領域において心筋マトリックスの広がった損傷および出血(*)を示した(d)。

20

【図6】図6は、HF-S、HF-RおよびARB処理ラットの血流力学パラメータを示す。ARB投与(7~11週からカンデサルタン 0.05 mg/kg/day)有無のRen-2トランスジェニックラットの血流力学評価。A、LVW/BW(%)、左心室肥大の代表値。B、LW/BW(%)、鬱血性心不全の発症を示す。C、LVEDPは拡張期機能障害の程度を示す。HF-SおよびHF-R動物の双方は、左心室肥大を有していた。高線維症形成スコアの動物は高めのLW/BWおよびLVEDPを有していた。これらのパラメータは犠牲前に測定した。HF-SおよびHF-Rにつき各々 $N = 4$ 、ARBにつき8。*、HF-S対HF-RおよびARBにおいて、 $P < 0.05$ 。

30

【図7】図7は、ラット心筋のピクロシリアス赤色染色切片の左心室コラーゲン体積フラクション分析の結果を示す。棒グラフは、LV間質性コラーゲンの定量を示す。1、対象；2、HF-R；3、HF-S；4、ARB。各群、 $N = 4 \sim 6$ ；#、 $P < 0.01$ 対対象；*、 $P < 0.05$ HF-S対HF-R；**、 $P < 0.05$ HF-R対SD。

【図8】図8は、Ren-2ラットにおいて異なって発現された遺伝子のドットプロットを示す。ガレクチン-3 mRNAレベルをラットのHF-S、HF-RおよびARB処理群と比較した。ドットの濃度および直径が、SD対象と比較した遺伝子発現のレベルに直接対応する。A、ホスホ-イメージャーは、HF-S、HF-RおよびARB処理ラットからのイメージを走査した。丸印をつけたドットはガレクチン-3 mRNA発現を表す。B、棒グラフは、濃度測定単位での定量したガレクチン-3の量を示す。各群、 $N = 2$ であり、各試料を2回スポットした。

40

【図9】図9は、ガレクチン-3、サイクリンD1およびE2F-1の免疫プロットである。ガレクチン-3のラット心筋ホモジネートにおける発現レベル：A1、代表的プロット；A2、GAPDHに対して正規化した濃度測定単位での定量；サイクリンD1：B1、代表的プロット；B2、GAPDHに対して正規化した濃度測定単位での定量。

【図10】図10は、ガレクチン-3、マクロファージおよびMHC-IIIの免疫組織化学共局在化を立証する。HF-Sラットの心筋から得られた平行切片は、A、ヘマトキシ

50

リンで反対染色された抗 - ガレクチン - 3 マウスモノクローナル抗体 ; B、マクロファージ特異的抗 C D 6 8 マウスモノクローナル抗体 ; C、M H C I I 抗原に対する O X - 6 マウスモノクローナル抗体で染色された。別の微視的視野は、マクロファージの濃厚浸潤を示す、D。H F - R 動物におけるマクロファージ浸潤は散在して見られ (E)、S D 対象において、よく保存された心筋モルホロジーが見られた、F。

【図 1 1】図 1 1 は、ヒト対象における L V H および H F の電気およびエコー心電図評価ならびに心筋ガレクチン - 3 遺伝子発現を評価する定量的リアルタイム P C R である。

A、S k o w l o w および L y o n 評価基準 (S V 1 + R V 5 > 3 5 m m) によって評価された左心室肥大。5 5 % より低い E F は代償不全状態にあるとみなされる。B、ヒトガレクチン - 3 プロブを用いたリアルタイム P C R。ガレクチン - 3 遺伝子発現がヒト心筋バイオプシーにおいてプロファイルされた。結果は、ハウスキーピング遺伝子、サイクロフィリンに対して正規化した。N = 6、*、P < 0 . 0 5 H F 対 L V H。

【図 1 2】図 1 2 は、1 0 週間バイオプシーにおけるガレクチン - 3 m R N A 発現を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 4 】

本発明は、以下の実施例および図面によってさらに例示される。

【実施例】

【 0 0 2 5 】

実施例 1

トロンボスポンジン - 2 : 増大した発現は不全となりそうな心肥大を同定する

心肥大は心不全 (H F) の危険を増大するが、いままでのところ、どの肥大心筋が急速に H F に進行するかを予想するのは困難であった。本発明によれば、肥大関連遺伝子から離れ、個別の不全関連遺伝子を不全が明確になる前に発現し、かくして、不全しがちな肥大心臓の分子予測を可能とすることが考え出された。1 2 ~ 1 4 週齢で H F に進行する高血圧性ホモ接合レニン過剰発現 (R e n - 2) ラットの心遺伝子発現 (1 2 , 3 3 6 クロオン) は 1 7 週間代償されたままの同腹仔による発現と比較した。代償された肥大 (1 0 週齢) の段階で採取された心臓バイオプシーは、発明者らが、同定した遺伝子の変化した発現が後の H F への進行に先行するかどうかを試験することを可能にした。H F ラットの心筋において過剰発現した 4 9 遺伝子を同定し、それらのマトリックス遺伝子は最大群を構成した。トロンボスポンジン - 2 (T S P 2) は、後に H F に進行したラットからのバイオプシーにおいてのみ選択的に過剰発現し、一方、脳内ナトリウム排泄増大ペプチド (B N P) は、この初期段階で、全てのラットにおいて上昇した。心臓マトリックスに対する T S P 2 の不存在の影響を試験するため、心筋梗塞 (M I) を T S P 2 - 不存在マウスにおいて誘発させた ; この手順は全ての T S P 2 不存在マウスにおいて心臓破裂を生じたが、野生型 (W T) マウスには全く見られなかった。結論として、T S P 2 は心臓マトリックスの剛直性の新規かつ重要なレギュレータであると同定された。

【 0 0 2 6 】

原料および方法

トランスジェニックラットおよび血流力学実験

ホモ接合 R e n - 2 ラットは、Max-Delbruck-Zentrum fur Molekular Medizin, Berlin, Germany から入手した。Sprague Dawley (SD) バックグラウンド上の 3 0 匹の雄 R e n - 2 ラットおよび、対象として、9 匹の年齢適合 S D ラットを実験した。3 0 匹の R e n - 2 ラットのうち、8 匹を 1 0 週齢で犠牲にし、8 匹を、7 ~ 1 3 週齢から、0 . 0 5 m g / k g / 日のカンデサルタン、アンジオテンシン I I 受容体 I 型ブロッカー (A R B)、で処理した。残りの 1 4 匹の未処理ラットのうち、6 匹を、心不全の臨床的徴候の発症から 1 3 週で犠牲にし、H F - S ラットと命名した。残りの 8 匹の R e n - 2 ラットを綿密にモニターし、不全の臨床的徴候がまだ表れていない 1 7 週で犠牲にした。これらのラットを H F - R ラットと命名した。犠牲前に血流力学パラメータを定量し、犠牲後に心臓、肺および体重を測定した。動物の世話および処理は動物実験委員会に承認された。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

10 週齢の R e n - 2 ラットからの 바이오プシー

12 匹の R e n - 2 および 4 匹の S D ラットからなる第 2 群を麻酔し、前胸部を胸骨にて剃毛した。ラットを自作ループの助けを借りて、保温パッド上の堅い板に固定した。先の丸い 20 ゲージ針を気管に入れて気管カニューレとして機能させた。このカニューレを、室内空気で 2 . 5 ないし 3 m l の周期体積および 80 呼吸 / 分の呼吸レートの従量式齧歯類呼吸器 (model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA) に連結した。さらなる手順は、マイクロ手術用顕微鏡の視覚的な助けを借りて行った。左の第 4 肋間に 5 m m の切開をして、胸郭に接近した。心臓の明瞭な視界を得た後、ゆっくりと回転するドリルに連結した特注の 0 . 3 5 m m 針を用いて 바이오プシーを採取した。全手順は、約 15 分間続いた。手術で生き延びた 9 匹の R e n - 2 ラットのうち、5 匹は 12 ~ 14 週齢の間に心不全を発症し、一方、残りの 4 匹のラットは 17 週間代償されたままでいた。

10

【 0 0 2 8 】

R N A の単離および逆転写

RNeasy Protocol (QIAGEN, Hilden, Germany) に準じて、RNeasy Mini Kit で、R N A を左心室から単離し、- 80 で保存した。抽出物の品質は、2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands) で、真核生物全 R N A ナノアッセイを用いて測定した。R N A は、PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, CA, USA) で、製造者の指示書に準じて、10 週齢ラットの心臓 바이오プシーから単離した。R N A は、リバーストランスクリプターゼで c D N A に転写し、250 m g のランダムプライマー (Invitrogen Life Technologies, Breda, The Netherlands) を用いた。

20

【 0 0 2 9 】

c D N A マイクロアッセイ

I n c y t e G E M - 2 / G E M - 3 ラット c D N A ライブラリー (全 12,336 遺伝子) を用いるマイクロアレイ上の分析のため、正規化ラット c D N A ライブラリーから単離した c D N A クローンを選んだ。各 c D N A の P C R 増幅インサートを処理ガラス面上に印刷して高密度アレイとした。これらのアレイ素子上で、2 匹の S D および 6 匹の R e n - 2 ラットの心筋 m R N A を用いて、3 つの異なる時点で、重複ハイブリダイゼーションを行った。数値の対数変換を行って、データを均質にし、> 1 . 7 倍の発現差のみが異なって発現されると考えられた。すでに詳細に記載されたように [Tan et al., Proc Natl Acad Sci. 99: 11387-11392, 2002; Bandman et al., Ann NY Acad Sci., 975: 77-90, 2002]、データマイニングおよびバリデーションのプロトコルを採用した。

30

【 0 0 3 0 】

配列決定、膜スポットティング、およびマクロアレイ用 c D N A ハイブリダイゼーション

マイクロアレイによって同定された異なって発現された遺伝子のクローンを I n c y t e g e n o m i c s から入手し、5' -GGTGAGACTATAGAAGAGC-3' プライマー (Eurogentec, Seraing, Belgium) で配列決定した。配列決定によって同一性が確認された後、プラスミドインサートを、5' -ACCATGATTACGCCAAGCTC-3' よび 3' -ACGACGGCCAGTGAATTGAA-5' プライマーとの P C R 反応によって増幅した。次いで、各クローンをナイロン膜 (マクロアレイ) 上に重複してスポットした。ドットプロットをパーソナル f x - ホスホイメジャー (Cyclone System Packard, Meriden, CO, USA) で走査した。個々のハイブリダイゼーションシグナルを同定し、Quantity One, Version 4.2.3 ソフトウェア (BioRad, Munich, Germany) を用いて、密度測定で定量した。グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H) をプロットの内部標準用のハウスキーピング遺伝子として選択した。

40

【 0 0 3 1 】

バイオインフォマティック分析

マイクロアレイ分析および多段階データマイニングストラテジーから選択された 49 の H F - 特異的候補遺伝子から転写された蛋白質配列のバイオインフォマティック分析を行った。それらの生物学的機能の注釈に基づき、以前は心筋内で同定されず、マトリックス関連蛋白質をコードする 3 つの候補遺伝子をリアルタイム P C R によるさらなる試験用に

50

選択した。

【0032】

プライマー、プローブおよびリアルタイムPCR

プライマーおよびプローブは、Primer Express Software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて GenBankTM で入手可能なラット配列から設計した。プローブは、Ensembl-Mouse Genome Sequencing Consortium and Ensembl-Human Genome Browserから誘導された保存されたエクソンスプライス部位から設計し、かくして、いずれの潜在的に汚染するゲノムDNA (表1) のアッセイによる認識を防止する。最適PCR条件は、2 mlの全量中、12.5 ml 2 × TaqmanTM アッセイ用PCR Master Mix、最終濃度5 mM MgCl₂、300 nMの各プライマー、200 nMプローブ、および10 ng cDNA鋳型であることが分かった。増幅および検出は、ABI Prism 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて行った。PCRデータは、ハウスキーピング遺伝子シクロフィリンAの発現レベルの相対で報告された。

【0033】

TSP2^{-/-}マウスにおける実験的MIおよびモルホメトリー

22匹の野生型(129 SvJ株)および16匹のTSP2不変異体(TSP2^{-/-})において、左腹側下行冠状動脈を結索することによって心筋梗塞を誘発させた。2匹の擬手術マウスを対照として用いた。エーテル麻酔後、1 mlの0.1 M CdCl₂を大静脈に注射することによって、これらのマウスを殺した。心臓を10分間5%バッファ化ホルマリンで灌流固定し、10%バッファ化ホルマリン中で一晚浸漬固定した。標準電子顕微鏡技術を用いて、野生型およびTSP2^{-/-}マウスの組織標本を評価した。線維症形成の程度を定量するために、コンピュータ化面積測定を、1切片あたり7カ所の無作為に選んだ視野で行った。各視野は400 μm²の面積であった。コラーゲン面積を、末梢血管および心外膜コラーゲンを除外し、選択的に左心室間質から定量した。コラーゲン面積フラクションは、1視野あたり、全心筋面積に対するピクロシリウス-レッド染色した面積の比率として計算した。この手順の詳細は以前に報告されている [Cherayil et al., Proc Acad Sci USA, 87: 7324-7328, 1990; Cleutjens et al., Am J pathol., 147: 325-338, 1995]。

【0034】

統計分析

データは平均 ± SEMで表す。ワンウェイ分散分析 (ANOVA) をDunnett ポストホック分析と組み合わせて用いて、各実験群 (カンデサルタン処理および2群の未処理レニン-トランスジェニックラット) のデータを比較して、多重比較のために補正した。SDラットを内部対照コホートとして用いた。分析は統計パッケージSPSS 10.0 (Chicago, IL, USA)を用いて行った。P値 < 0.05は統計的に有意であるとみなした。

【0035】

結果

Ren-2ラットのサブセットの顕在的な心不全および死亡への急展開

左右の心室の肥大が、10週目に犠牲にした8匹のラットおよびそれよりも遅い日に犠牲にした他の未処理ラットにも見られた。SD対照にはLVHは見られなかった。プラセボの14匹のラットのうち6匹が12ないし14週齢の間に顕在的な臨床HFに急展開し、17週間の観察期間中代償されたままの8匹のラットと比較して抑制された心機能インデックスを有していた。胸膜滲出液およびdP/dt_{max}における急下降がHF-Sラットに見られ; これらの変化はHF-Rラットには見られなかった (表2)。アンジオテンシンIIブロックは、13週で犠牲にした動物を評価したとき、心臓の肥大および不全の発症を完全に防止した (LV重量/体重%、2.52 ± 0.36、dP/dt_{max}、8400 ± 202)。

【0036】

マイクロアレイは心不全の疑いのあるラットにおいて過剰発現した49の遺伝子を明ら

かにした。

マイクロアレイ分析について、本発明者らは、まず、HF-SおよびHF-R群の間で、遺伝子発現における生態多様性を調査した。HF-SおよびHF-Rの2つの群におけるほとんどの遺伝子の発現レベルは非常に似通っていた。発現用にプロファイルした総数12,336の遺伝子から、49の遺伝子のみが多段階データマイニングストラテジーを生き残り(図1)、HF-Sラットにおいて過剰発現した。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)トランスヒドロゲナーゼが、心筋欠如で低下した発現を示した唯一の遺伝子であった。特に、オステオアクチジン、TSP2、いくつかのプロコラーゲンおよびトロンボスポンジン-1が増加した。同定された遺伝子の多くが既知の機能を持つ蛋白質をコードし、一方、それ以外は、未知の機能の遺伝子に対応し、新規遺伝子および心臓で今まで見出されていない遺伝子を含む。

10

【0037】

バイオインフォマティック分析は、3つの心臓マトリクス関連遺伝子に指向した。

HFにおける過剰発現遺伝子の多くの機能に関して情報が入手できなかったので、本発明者らは、49の遺伝子全てをバイオインフォマティック分析にかけた。最初、本発明者らは、いくつかの調査/整列ツールを組み合わせることで急速かつ正確に遺伝子ファミリーを提供するGeneFIND(Gene Family Identification Network Design)システム(<http://www-nbrf.georgetown.edu>)を用いて、HFの疑いのある遺伝子の広い機能的分類を行った。このストラテジーは、ほとんどの過剰発現遺伝子がマトリクス関連蛋白質をコードすることを示した。特に、選択された3つの疑いのある遺伝子(オステオアクチビン、トロンボスポンジン-2およびコラーゲンVI)の機能は、今まで、心筋において報告されていない。

20

【0038】

マクロアレイはアンジオテンシンIIブロックによるHFの疑いのある遺伝子の正常化を示した。

このアンジオテンシン主導型心不全モデルにおけるレニン-アンジオテンシン系(RAS)活性化の役割を確かめるために、本発明者らは、7ないし13週齢のRen-2ラットのサブグループを(プレッサー下用量)のカンデサルタンで処理した後マイクロアレイによって同定された標的遺伝子の発現を再評価した。血流力学の向上に加えて、ARB処理は全てのHF関連候補遺伝子の過剰発現を防止した(データ示さず)。

30

【0039】

10週間の心筋バイオプシーは後にHFに急進行するラットにおいてTSP-2アップレギュレーションを示した。

HFが血流力学および臨床的に顕在化する前に心筋における3つのマトリクス関連遺伝子の発現状態を評価するために、本発明者らは、自発鼓動するラット心臓の心筋バイオプシーを得る技術を開発した。バイオプシー後、ラットを回復させて、それが心不全に対して耐性または感受性であることを証明するかどうかを決定した。この新規アプローチは、われわれが、不全が顕在化する前に遺伝子発現のレベルを立証することを可能とした。TSP2発現は、12~14週以内に急性心臓代償不全を起こしたラットにおいてのみ、早期肥大段階(10週間)にて著しく増大したが(図2a)、その後も代償されたままのラット心臓でも非トランスジェニック対照ラット心臓でも、この段階ではアップレギュレートされなかった。オステオアクチビン(図2b)およびコラーゲンVI(図2c)のごとき、他のHF関連遺伝子の発現レベルは、後に不全を起こすラットおよび対照と比較して代償されたままのラットの双方において、早期肥大段階で増大した。重要なことに、心臓の肥大および不全の広汎に用いられるマーカーは、後の代償または不全にかかわらず、全てのラットにおいて10週バイオプシーでアップレギュレートし、それゆえ、不全耐性ラットから不全感受性ラットを識別できなかった(図2d)。本発明者らによる初期のマイクロアレイ実験によれば、これら3つの遺伝子の発現は、心不全の進行によって、10週発現レベルの2倍以上にまでさらに増大した。代償ラットは、10週にて高いオステオアクチビン、コラーゲンVIおよびBNPを有するにもかかわらず、17週にて犠牲に

40

50

した時点でこれら遺伝子の発現レベルにさらなる著しい増大は見られなかった（データ示さず）。

【0040】

TSP-2ノックアウト(TSP^{-/-})マウスは急性心筋梗塞で生き残れなかった。

心不全の様々なラットモデルに反して、丹念に記録された過負荷に应答して確実に心不全を発症するラットモデルはない。それゆえ、本発明者らは、22匹の野生型ラットおよび16匹のTSP^{-/-}マウスにおいて腹側心筋を梗塞させて、急性の心筋構造損傷およびその結果の急速心臓再構築におけるTSP²の生物学的役割の解決に努力した。梗塞はTSP²なしマウスには耐えられなかった。全てのマウスがMIの最初72時間以内に死亡したからである。一方、手術直後の合併症により死亡しなかった野生型マウスの100%が生き残った（図3）。MIの48時間後のコンピュータ化モルフォメトリーは、野生型マウスと比較してTSP²なしマウスにおいて、心筋コラーゲンの反応性増大が完全に欠如していることを示した（各々、 $0.38 \pm 0.05\%$ および $0.70 \pm 0.04\%$ ； $p < 0.05$ ）（図4）。光電子顕微鏡はTSP²なしマウスにおいて心筋マトリクスの広範囲にわたる分裂を明らかにした。野生型マウスは一匹もこの発現型を示さなかった（図5）。

10

【0041】

考察

この実験で、TSP²の増大した心発現は顕在化した心不全に進行しがちな肥大心臓を同定することが立証された。さらに、TSP²は急速心負荷(acute cardiac loading)に対する効果的な应答を行うのに必要とされることが示された。その反対に、肥大様BNPの既知のマーカは、全ての形態の心肥大において例外なく増大し、それゆえ、不全感受性および不全耐性の肥大を区別できなかった。

20

【0042】

トロンボスポンジンのファミリーは、血管および血栓の疾患において広汎に研究されているが、心不全におけるトロンボスポンジンについて重要な役割を実現させる報告はない。本発明者らの発見は、TSP²は、直接的または間接的に、心臓マトリクス生物学における重要な機能を行うのであろうことを示唆する。

【0043】

TSP²は、その機能が多様であり完全には理解されていない分泌性マトリックス細胞間蛋白質(a secreted extracellular matrix protein)である。TSP²に近接した相同体は、線虫(Caenorhabditis elegans)またはショウジョウバエ(Drosophila)のゲノムには見つからないので、この蛋白質は、脊椎動物における細胞マトリクス相互作用の増大した複雑性を対処するために進化したようである。

30

【0044】

細胞外マトリクスの組織化におけるTSP²の役割についての証拠として、TSP²-不存在マウスにおける以前の研究は、TSP²発現の喪失の結果、不規則な輪郭を持つ異常に大きなコラーゲルフィブリルが得られることを示している、さらに、TSP²-不存在マウスの皮膚はもろく、低下した聴力を有する。TSP²-ふそん剤の皮膚線維芽細胞は、基底へのその付着に欠陥があり、それらの培養において増大したレベルのマトリクスのメタロプロテイナーゼ-2(MMP-2)を有する。現在の研究は、心筋におけるTSP²に対して2つの明らかに矛盾する機能を同定する。Ren-2ラットにおける慢性高血圧症において、TSP²の増大した心臓発現は、心不全の傾向がある動物を同定する。この应答は、TSP²の発現が有害であることを示すようであるが、該应答が、延長された期間の間、以前として代償されるラットにおける应答と比較して、後に明白な不全に進行するラットにおける強調された従前に活性化された負傷应答を反映するようである。TSP²の発現は成体動物における負傷に対する应答に特徴的であることがよく確立されている。他方、マウスにおける実験的心筋梗塞においては、TSP²の存在は心臓破裂に対して明らかに保護する。2つの実験系は異なる種が関連し、TSP²-不存在マウスの場合には複雑な代償変化が存在しそうな故に比較するのが困難であるが、結果の双方の

40

50

組は、代償後における十分に機能的な細胞該マトリックスを生じさせるにおいて、TSP2に対する重要な役割に合致する。TSP2 - 不存在マウスにおける切開皮膚創傷治癒の場合には、TSP2の不存在は有利であるようにも見える。なぜなら、創傷治癒のその特別な形態においては、脈管形成および MMP - 2 における得られた増加は、この組織に存在することが知られているコラーゲン線維の予め存在する構造的変化にもかかわらず治癒を加速するからである。しかしながら、心臓組織の以前の固有の弱点が、心筋のマトリックスにおける同様な異常性のため、梗塞後に心臓破裂に対する素因があることが示唆されている。

【0045】

本データは、不全への進行に対して TSP2 の増大した心臓発現が先行することを示唆している。トロンボスポンジンはインテグリンに結合できることが知られているので、TSP2 はインテグリンシグナリングを介してプロ - 線維症効果を媒介する可能性がある。最近、Zhang et al. (J Clin Invest 111: 833-841, 2003) は、アダプター蛋白質遺伝子 Grb2 のハプロ不全を持つマウスが圧力過剰負荷に応答する心臓線維症に対する抵抗性であると報告している。Grb2 は、機械的なストレスに由来し得る病巣接着キナーゼのインテグリン - 媒介活性化で補充される。我々の研究においては、我々は、1 インテグリンが、その発現が高血圧 Ren ラットの心臓で明らかに増加しており、かつ不全心臓においてさらに増大した遺伝子の中にあることを見出した。この知見が、イン・ビトロでの心臓線維芽細胞の伸長が 1 インテグリンの蛋白質レベルを増加させたという我々の最近の観察によって実質化された (S. Pokharel and Y.M. Pinto, 未公表データ)。

【0046】

コラーゲンの定量のためのピクロシリウス (picrosirius) 赤色染色技術は、オレンジ色 - 赤色の目に見える偏光を示すコラーゲン線維のサイズ、整列、およびパッキングに依拠することに注意すべきである。TSP2 - 不存在マウスは、異常なコラーゲンフィブリルおよび線維構造、特にあまり組織化されていない線維および不規則かつより大きなフィブリルを有するので、測定された複屈折はこれらの変化によって影響された。

【0047】

結論として、本発明によると、TSP2 が心臓マトリックスの一体性の非常に重要なレギュレーターとして機能することが提唱される。増大した細胞外マトリックス形成は、圧力過剰負荷 - 誘導心不全の実験的および臨床的形態を共に特徴付けるので、TSP2 の初期の発現は、代償された肥大から心不全への転移で非常に重要であるマトリックス応答を反映するであろう。これらの観察は、TSP2 の心臓過剰発現の初期の検出が、心不全にかかりやすい肥大心臓を同定でき、心不全に進行する傾向がある患者の初期同定およびおそらくは該患者の治療を促進することであろうことを示している。

【0048】

実施例 2

ガレクチン - 3 は不全にかかりやすい肥大心臓における活性化されたマクロファージをマークする。

マクロファージ化学誘因蛋白質および種々のサイトカインの増大した心筋発現は、マクロファージが心不全 (HF) に関与することを示唆した。しかしながら、マクロファージが既に確立された負傷に単に応答するのか、あるいは HF の初期段階に積極的に関与するのかは明らかではない。高血圧 (HF) におけるこれらのメカニズムを調べるために本発明者らは、ホモ接合性高血圧 TGR (mRen2) 27 (Ren - 2) ラットを使用した。これらのラットは 10 週齢までに不変的に心臓肥大を発生し、その後、いくらかは 17 週までに代償され、他方、他は 12 ないし 14 週齢程度までに不全および死亡まで進行する。この研究は、心臓ガレクチン - 3 の発現が不全へ進行する傾向がある肥大心臓を特異的にマークする。マクロファージは不全の傾向がある肥大心臓において初期にかつ特異的に活性化されるように見え、マクロファージ由来メディエーター様ガレクチン - 3 は心臓線維症の発生および HF に向けての進行に寄与するであろう。

【0049】

10

20

30

40

50

材料および方法

トランスジェニックラットおよび血流力学的研究

ホモ接合性 R e n - 2 ラットはMax-Delbruck-Zentrum fur Molekulare Medizin, Berlin, Germanyから入手した。我々は、非 - トランスジェニックバックグラウンドでSprague Dawley (SD)ラットからの16匹の雄 R e n - 2 ラットおよび8匹の年齢が合致した対照を実験した。16匹の R e n - 2 ラットのうち、8匹を、7ないし13週齢から、0.05 mg / kg / 日のカンデサルタン、アンジオテンシンII受容体I型ブロッカー (A R D) で処理した。8匹の未処理 R e n - 2 ラット内では、H F の発生に際して4匹を13週において犠牲にした。残りの4匹の R e n - 2 ラットをモニターし、17週において犠牲にし、その時、臨床的不全の兆候は出現しなかった。血流力学を10週において、および犠牲にする前に取った。心臓、肺および体重を犠牲にした後に測定した。動物のケアおよび治療の手法は、動物愛護協会によって認められたものであった。

10

【0050】

10週齢 R e n - 2 ラットからの心筋バイオプシー

12匹の R e n - 2 および4匹のSDラットの第2の群を麻酔し、平滑な20 - ゲージ針を気管に入れて、気管カニューレとして供し、これを2.5ないし3mlの周期体積容量および80呼吸/分の呼吸速度にて部屋内の空気中の周期体積齧歯類呼吸器(model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA)に連結した。ミクロ - 切開顕微鏡の視覚的助けを借りて、左第4肋間空間において5mmの切開を行って、胸部にアクセスした。特注の0.35mm針を用いてバイオプシーを採取した。

20

【0051】

cDNAマイクロアレイ

正規化されたラットcDNAライブラリー(合計12,336遺伝子)から単離されたcDNAクローンを、マイクロアレイ(Incyte Genomics, CA, USA, ラット GEM-2/3)での分析ように選択した。各cDNAのPCR増幅インサートをガラス表面上の高密度アレイとして印刷した。2匹のSDおよび6匹の R e n - 2 ラット心筋mRNAを含む3つのガラスチップにて3つの異なる時点で2連ハイブリダイゼーションを行った。H F - S群における少なくとも2倍の過剰発現を伴う発現の統計学的に有意な($P < 0.001$)変化を示した標的遺伝子を、該遺伝子が独立して4回評価して、信頼性のレベルを改善するように、さらなる分析用のサブ - アレイに再度印刷した。データのマイニング(Tan FL et al., Proc Natl Acad Sci., 99: 11387-11392, 2002)および確証のためのプロトコルを、従前に詳細に記載されているように採用した(Bandman O et al., Ann NY Acad Sci. 975: 77-90, 2002)。

30

【0052】

プライマーおよびプローブ

ガレクチン - 3 に対して特異的なプライマー (順方向、5'-CCCGACTGGACCACTGACA-3', 逆方向、5'-CAGCATGCGAGGCATGACT-3' およびプローブ、5'-TGCCCTACGATATGCCCTTGCCCTG-3') を Primer Express Software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いる Gen Bank™ で入手可能な配列から設計した。

40

【0053】

RNA単離およびリアルタイムPCR

RNeasy Mini Protocol (QIAGEN, Hilden, Germany) に従った R N e a s y M i n i K i t で、RNAをラット左心室から単離し、-80 で貯蔵した。製造業者の指示に従って、PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, CA, USA) でラット心臓バイオプシーからRNAを単離した。最適なPCR条件は、25μlの合計容量中の、最終濃度5M MgCl₂を含むTaqman™ アッセイ用の12.5μm 2xPCR Master Mix、300nMの各プライマー230nMのプローブおよび10ng cDNA鋳型であることが判明した。

【0054】

マクロアッセイのための配列決定、膜スポットティングおよびcDNAハイブリダイゼー

50

シオン

マイクロアレイによって同定された異なって発現された遺伝子のクローンは *Incyte genomics* から入手され、5'-GGTGACACTATAGAAGAGC-3'プライマー (Eurogentec, Seraing, Belgium) で配列決定した。同一性を確認した後、プラスミドインサートは5'-ACCATGATTACGCCAAGCTC-3'および3'-ACGACGGCCAGTGAATTGAA-5'プライマーでのPCR反応によって増幅した。次いで、各クローンをナイロン膜(マイクロアレイ)に二連でスポットした。ドットプロットをパーソナル *fx-phosphorimager* (Cyclone System Packard, Meriden, CO, USA) でスキャンした。

【0055】

蛋白質の単離およびウエスタンブロッティング

蛋白質の単離およびウエスタンブロッティングは、従前に記載されているように行った、一次抗体(ガレクチン-3)生物試薬; ED-1およびOX-6, Dr. M. de Winther, Department of Molecular Genetics, University of Maastricht, The Netherlands)からの親切な贈り物)をTWEEN-20を含むトリス-緩衝生理食塩水で1/1000希釈した(TBS-T)。二次抗体(ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートedig G, Cell Signaling Technology)をTBS-Tに1/2000希釈した。製造業者の指示に従って増強されたケミルミネセンス(ECL, Amersham, Arlington Heights, IL, USA)によって蛋白質バンドを可視化した。

10

【0056】

免疫組織化学、ガレクチン細胞化学および共焦点顕微鏡

ガレクチン-3および接近可能な結合部位の発現は、従前に記載されているように特異的抗-ガレクチン-3モノクローナル抗体およびビオチニル化ガレクチン-3によって可視化された(Gabius et al., *Anal Biochem.*: 189: 91-94, 1990)。他の文献に詳細に記載されているように、(Andre et al., *Chembiochem.* 2: 822-830, 2001)、ガレクチン-3を活性-維持条件下でビオチニル化した。共焦点レーザー走査型顕微鏡において、ガレクチン結合部位がFITC-標識アビジンによって検出された。テキサスレッド標識二次抗体を用いて、増殖する核抗原(PCNA)を免疫細胞化学的に可視化した。該手法についてのさらなる詳細は他の文献で入手できる(Broers et al., *J Cell Sci.*: 112 (Pt 20): 3463-3475, 1999)。

20

【0057】

心臓線維芽細胞増殖およびプロリン取り込みアッセイ

ラット心臓線維芽細胞は従前に記載されているように2日齢新生Sprague-Dawleyから単離した(Pokharel et al., *Hypertension*, 40: 155-161, 2002)。1%L-グルタメート、50U/mLペニシリンおよび0.1g/mLストレプトマイシンと共に10%胎児ウシ血清(FBS)を補足したイーグル培地(DMEM)のダルベッコウ修飾培地中で細胞を培養し、湿潤化5%CO₂雰囲気中にて37°Cでインキュベートした。接種から24時間後に0.5%FBSを含有する培地との24時間のインキュベーションによって細胞を休止させた。次いで、細胞をネズミ組換えガレクチン-3(対照, 10μg/mL、30μg/mL)で24時間処理した。分裂する細胞の数を放射線標識メチル-[³H]チミジン取り込み(ウエル当たり0.5μCi)沸性によって測定した。放射能は、LKDW Wallaceベータカウンタ(FSA Laboratory Supplies, Loughborough, UK)を用いて線維芽細胞およびシンチレーション液体中で測定した。分泌したコラーゲンを、[³H]プロリン取り込みアッセイを用いて測定した。簡単に述べれば、心臓線維芽細胞を90ないし100%密集にて6-ウエルプレート中に接種した。インキュベーションの最後の24時間の間に15Ci/mL L-[³H]プロリンを加えた。条件培地から取り込まれた[³H]プロリンを10%トリクロロ酢酸(TCA)で沈殿させ、シンチレーションカウンタでカウントした。

40

【0058】

統計学的解析

データは平均±SEMとして表す。各実験についてのデータをDunnettのポスト-ho

50

c 分析と組み合わせて、ワン - ウェイ偏差分析 (ANOVA) を用いて比較して、内部対照コホルトとしてSDラットを用いて複数の比較につき修正した。統計学的パッケージSPSS 10.0 (Chicago, IL, USA) を用いて解析を行った。P - 値 < 0.05 は統計学的に有意であると考えられている。

【0059】

結果

HF - Sラットにおける損なわれた心機能および心臓線維症

8匹のプラセボ処理ラットにおける肥大した左および右心室を観察した。対照的に、カンデサルタン処理ラットおよび非 - トランスジェニック対照においてLVの増加はなかった。処理無しの8匹のラットのうち、4匹は12ないし14週齢の間に明白な臨床的HFを発症し、これには機能低下した心臓機能の支障が伴った。残りの4匹のラットは17週間の実験期間の間に代償されたままであった。胸膜滲出を持つ明白なHF (肺重量 / 体重 % HF - S, 10.61 ± 0.7 vs HF - R, 4.97 ± 0.2 , $P < 0.001$) および上昇した左心室終末 / 弛緩期圧力 (LVEDT) は、HFラットにおいて明らかである。これはHF - Rおよび / またはARB処理ラットには存在しなかった (図6 a、b および c)。10週において、全てのプラセボ - 処理Ren - 2ラットはLVHを有したが、代償不全に対する血流力学的証拠は有しなかった。(LV重量 / 体重 % : Ren - 2, 3.88 ± 0.08 vs 非トランスジェニック対照 2.15 ± 0.2 、および dP / dt_{max} : Ren - 2, 8556 ± 296 vs 非 - トランスジェニック対照 8780 ± 373)。コンピューター援助電子トメトリーによって測定された心筋コラーゲン含有量は、HF - Rラットと比較してHF - Sラットにおけるより高度な心臓線維症を明らかにした。ARBは、それが正常血圧バックラウンド株のそれと匹敵したままであるように、LVHおよび心筋コラーゲン含有量を正規化した (図7)。

【0060】

マイクロアレイはHF罹患性ラットにおける免疫 - 関連遺伝子の豊富さを明らかにする。

まず、我々はHF - SおよびHF - R群の間の遺伝子発現の生物学的変動を調べた。双方の群からの試料の対の間のほとんどの遺伝子の発現レベルは高度に相関した。我々は、不全および非 - 不全肥大心臓の間の異なって発現された遺伝子に焦点を当てた。

該値のLog変換を行い、2倍閾値を超える発現レベルの統計学的に有意な ($p < 0.05$) 差のみが異なって発現されたと考えられた。ガレクチン - 3は最も顕著に過剰発現された遺伝子として出現し、HFラットにおいて、5倍を超える上昇であった (表3)。興味深いことには、主要組織適合性複合体抗原II (MHC - II) および免疫グロブリン受容体遺伝子はこれらの過剰発現された遺伝子内であった。

【0061】

マイクロアレイは、アンジオテンシンII遮断によるHF罹患性遺伝子の正規化を明らかにする。

HFにおいて、異なって発現された遺伝子を確認するために、我々は、まず、配列決定によってクローンの同一性を確認し、その結果、別々の生体試料における反復ハイブリダイゼーションのためにこれらの遺伝子をナイロン膜マイクロアレイ上に再度スポットした。これにより、最初にマイクロアレイによって同定された7つの主な指標遺伝子の過剰発現が得られた。HFのこのアンジオテンシン駆動モデルにおけるレイン - アンジオテンシン系 (RAS) 活性化の役割を確認するために、我々は、Ren - 2ラットのサブ群を7週齢から13週齢までにサブプレッサー用量のカンデサルタンで処理した後に、マイクロアレイによって同定された標的遺伝子の発現を再度評価した。アンジオテンシンII遮断は、心臓の肥大および不全の活性を完全に妨げた。遺伝子発現のレベルにおいては、それは全てHF - 関連候補遺伝子の過剰発現を妨げた。顕著にはガレクチン - 3遺伝子の発現も妨げられた。

【0062】

ウエスタンブロッティングは不全心筋層において高いガレクチン - 3発現を示す。

10

20

30

40

50

ガレクチン - 3 の頑強なトランスクリプトマル増加を仮定し、我々は心筋層におけるその蛋白質レベルに焦点を当てた。マイクロ/マクロアレイで得られた結果と匹敵して、ガレクチン - 3 発現の最高レベルが、最高程度の心臓線維症を有し、13週までに心臓代償不全を迅速に発生した動物の同一群で観察された ($HF - S$, 94.6 ± 8.9 ; $HF - R$, 35 ± 5.6 ; $P < 0.01$) (図8aおよびb)。

【0063】

CD68陽性、MHCII抗原およびガレクチン - 3 の共 - 局所化

我々は、免疫組織化学によってラット心筋層におけるガレクチン - 3 の分布をモニターした。組織学的には、HF罹患性ラットは線維症のパッチ領域を明らかにした。非 - 患部領域における組織の人工物がよく保存されていた。対照的に、高線維症のこれらの領域はARB処理およびSDラットでは観察されず、また、肥大した非 - 不全HR - Rラットでも観察されなかった。重要なことには、ガレクチン - 3 陽性領域は、顕著な組織損傷および高レベルの線維症を示した。形態学的には、ガレクチン - 3 陽性細胞はかなり大きかった。これらの細胞はマクロファージであるという仮定を確認するために、我々は、マクロファージ特異的抗体 (ED - 1) で系列的切片を分析した。ガレクチン - 3 陽性領域はマクロファージ特異的染色と共 - 局所化された。これらのマクロファージはMHC - II抗原もまた強く発現し、これは、抗原提示におけるこれらの細胞の能動的な役割を示す。これらの特徴はHF - Rラットおよび非 - トランスジェニック対照においては明らかでなかった。

10

【0064】

心臓線維芽細胞におけるガレクチン - 3 結合部位

マクロファージにおけるガレクチン - 3 の強い発現を定義し、我々は、ガレクチン - 3 が心臓線維芽細胞に結合するか否かを決定した。我々は、ビオチニル化ガレクチン - 3 を用いて心臓線維芽細胞上のガレクチン - 3 の結合部位を可視化した。0.1%トリトン - 浸透において、ガレクチン - 3 結合部位の存在の結果、散漫な細胞質ならびに周辺染色が休止細胞において生じた (図10a)。対照的に、増殖する線維芽細胞は核の周りに増強された染色を示し、これは、染色プロフィールにおける有糸分裂 - 関連改変を明らかとする (図10b)。このパターンは、共焦点顕微鏡によって独立してモニターされた。事実、これらの実験は、ガレクチン - 3 が過剰発現された状態での反映する細胞周期活性化を喚起する増殖する (すなわち、PCNA陽性) 心臓線維芽細胞における核の周りでの接近可能なガレクチン - 3 リガンドのコンパクトな存在を確認した (図10c、dおよびe)。

20

30

【0065】

ガレクチン - 3 は線維芽細胞の増殖およびコラーゲンの生産を誘導した。

心臓線維芽細胞における接近可能な部位の存在に対する証拠をそのようにして提供し、我々は、ガレクチン - 3 が心臓線維芽細胞の増殖を刺激するか否かを決定した。組換えガレクチン - 3 を用い、我々は増殖アッセイを行った。ガレクチン - 3 は血清を豊富化するまたは豊富化することなく異なる濃度で加えた (0、10および30 $\mu g / ml$)。我々は、24時間にわたって10および30 $\mu g / ml$ 外因性ガレクチン - 3 での心臓線維芽細胞増殖の有意な増加を観察した (30 $\mu g / ml$ におけるガレクチン - 3、1分あたり 347 ± 17.5 カウント (cpm); 10 $\mu g / ml$ におけるガレクチン - 3 309 ± 4.8 cpm; 対照、 145 ± 4.8 ; $p < 0.01$)。次いで、我々は、放射性プロリン - 取り込みアッセイを用いて、外因性ガレクチン - 3 を添加した心臓線維芽細胞によるコラーゲン生産をモニターした。培地中30 $\mu g / ml$ のガレクチン - 3 にて、プロリン取り込みはほぼ66%だけ増加した (30 $\mu g / ml$ におけるガレクチン - 3、 1066 ± 56 cpm; 対照、 707 ± 52.8 cpm; $p < 0.05$)。より低い濃度のガレクチン - 3 は有意な効果を生じなかった (10 $\mu g / ml$ におけるガレクチン - 3、 992 ± 72 cpm; $p = 0.13$)。

40

10週における心筋層バイオプシーは、後に迅速にHFまで進行したラットにおいて高いガレクチン - 3 発現を示した。

50

【0066】

H Fは血流力学かつ臨床的に明らかとなる前に(すなわち、10週齢)心筋層におけるガレクチン-3の発現状態を評価するために、我々は、自然発生拍動ラット心臓において心臓バイオプシーを得るための技術を開発した。バイオプシーの後、ラットを回復させ、それがH Fに対して回復性であるか、またはむしろ罹患性であるかを決定した。リアルタイムPCRによって測定して、ガレクチン-3遺伝子の心筋発現は後にH Fまで進行したラットにおいてのみ増加し(任意単位、 5.8 ± 0.17)、他方、引き続いて代償されたラットにおいては比較的低いレベルで発現され(3.4 ± 0.2)、および非-トランスジェニック対照ラット心臓においてもそうであった(2.5 ± 0.033) (図12)。

10

【0067】

考察

本実験は、肥大した心室において特異的に補充されたメカニズムが不全に至ることを突き止めることを目的としたものであった。我々は、ガレクチン-3、マクロファージ発現蛋白質が、不全-傾向がある肥大した心臓で初期においてかつ特異的に発現されることを証明した。さらに、我々は、ガレクチン-3が心臓線維芽細胞において細胞内結合部位に結合し、心臓線維芽細胞の増殖およびコラーゲンの生産を活性化することを確立し、これは、これが心筋の強さおよびおそらくはH Fへの進行に寄与し得ることを示唆する。

以前の実験は、H Fにおけるマクロファージおよび炎症応答に対する役割を提唱した。しかしながら、これらの実験は、マクロファージの活性化がH Fに先行するか、または単にそれに伴うものであるかという答えられていない疑問を残した。さらに、マクロファージを心臓線維症に結びつける特異的なメカニズムに対する説明は未だなされていない。

20

腹膜マクロファージの表面上の抗原として最初に同定され、ガレクチン-3はガレクチンファミリーの唯一のキメラ-タイプのメンバーである。それは、 α -ガラクトシドならびに蛋白質に対するカルシウム-依存性特異性を有するレクチン基を有し、マクロファージの食作用カップおよびファゴソームに位置する。その抗-アポトーシスおよび成長促進作用以外に、ガレクチン-3は単球化学走性、ケモキネシスを調節し、サイトカインの利用性を変調する。さらに、最近の研究は、ガレクチン-3が、Fc受容体(FcR)によって架橋された場合に、マクロファージによるファゴサイトーシスにおいて非常に重要な役割を演じることも検証している。

30

【0068】

興味深いことに、我々は、我々のH FモデルにおいてFcRの過剰発現も観察した(表3)。

10週齢ラットから得られたバイオプシーが、迅速な不全に移行したラットにおいてのみ増大したガレクチン-3発現を示した。ガレクチン-3のプロ-炎症および線維芽細胞増殖促進作用を仮定すれば、この段階における増大した発現は不全に誘導する環境に寄与し得る。我々の知見によれば、マクロファージ(すなわち、クッパー細胞)の肝臓-アナログによって発現されたガレクチン-3は、肝臓における過剰なフィブリル-形成コラーゲンの合成を誘導することに関連付けられている。これは、ガレクチン-3がマクロファージ関連プロ-線維症メディエーターであり、マクロファージ浸潤によって特徴付けられる条件における心臓再形成に影響する能力を持つなもう一つの炎症浸潤サイトカインであることを示唆する。どのようにしてガレクチン-3がH Fに向けての進行に加わるかについての別の仮定は、コラーゲン架橋および心筋層の固さにおいて非常に重要な役割を有する進歩したグリコシル化最終産物(RAGE-3)に対する第3の受容体としてのガレクチン-3の発見から現れるものである。

40

【0069】

我々は、また、ガレクチン-3が細胞内受容体に結合し、心臓線維芽細胞の増殖を誘導し、コラーゲンの生産を強めることを記載する。炭水化物結合性蛋白質として元来は発見されたが、ガレクチン-3がグリココンジュゲート以外に細胞内標的と特異的に相互作用することが知られている。以前の研究は、Mac-2結合蛋白質、およびラミニンを含め

50

たガレクチン - 3 結合部位としていくつかの分子を提案している。しかしながら、何が増殖する細胞におけるガレクチン - 3 結合エレメントの迅速な核周囲の移動を誘導するかは依然として知られていない。それが分裂する核からのガレクチン - 3 結合部位の輸出である（遠心移動）か、あるいはそれがこれらの受容体の核転移に対する細胞質に向けられているか（求心移動）はさらに探求する必要がある。

現在の研究は、HF に対する左心室肥大からの進行において免疫系活性化およびガレクチン - 3 の生産に対して鍵となる役割を示唆しており、およびプロ - 免疫およびプロ - 線維症因子の間のリンクを証明する。F に先行するガレクチン - 3 の増大した発現は、肥大した不全心室におけるマクロファージの初期の異常な活性化を反映し得る。ガレクチン - 3 は、今度は、活性化されたマクロファージから心臓線維芽細胞へのシグナルをリレーすることができる。ガレクチン - 3 の末梢検出は、HF のプレディクター、およびガレクチン - 3 の作用の治療的阻害として働くことができ、過剰な心臓線維症に逆作用する新規な治療的標的となることができる。

10

【0070】

実施例 3

ヒト血清におけるガレクチン - 3 の評価

ガレクチン - 3 のレベルを、心血管病を持つ患者の血清で測定した。ELISA によってガレクチン - 3 を測定するための商業的に入手可能なキットを使用した。結果を表 4 ないし 6 にまとめる。ガレクチン - 3 は心不全、LVH のような心血管病を持つ患者の血清で有意に上昇した。さらに、健康なコントロール対象におけるガレクチン - 3 レベルに対する上限が見出されており、これはほとんどの CHF 患者において顕著である。

20

本発明によると、ヒト対象の血清中のガレクチン - 3 の測定は、信頼性よく、非 - 病気の対象から病気を区別し、従って、既知の筋肉細胞マーカー（BNP）と組み合わせ、非筋肉細胞病プロセスについてのさらなる情報を最初に提供した。

データテーブル：

LVH = 高血圧症、肥大

CHF = 心不全

Infl = 炎症性血管病

Poscon = 病気の混合した群

Infarct = 梗塞患者

Healthy = 健康なコントロール

30

【0071】

【表 1】

表 1 候補遺伝子転写体のリアルタイムの定量的 R T - P C R プライマーおよびプローブの配列

遺伝子/プライマー	配列 (5' → 3')	位置	種	
シクロフィリン A (M19533)				
Fwd	GGGAGAAAGGATTTGGCTATAAGG	167-190	ラット	
プローブ	TGAAGTCACCACCCTGGCACATGAAT	219-244		
Rev	GCCACCAGTGCCATTATGG	249-267		10
トロンボスポンジン 2 (XM_214778)				
Fwd	GAAATGGTCTACTTCTCAGACCTCAA G	603-629	ラット	
プローブ	CCCTGCTCTCTAGGCATCTCTGCACT CAT	631-659		
Rev	GCACACTGCTGGAGCTGGA	791-809		
オステオアクチリン (NM_002510)				
Fwd	GGACTTCATTGTGACCTGCAAA	1350-1371	ラット	
プローブ	CCACTCCCACGGAAGCCTGTACGAT	1376-1400		
Rev	ACCCTGTTCTGGGCGATCT	1421-1439		20
コラーゲン VI (TC322135)				
Fwd	CCCTCCTTGCAGGCAGAAC	816-834	ラット	
プローブ	ATGCCTTGCAGATCAATAACACAGCA GTAGG	845-875		
Rev	CAGGAGGACCGAGAGCTCAT	897-916		
脳ナトリウム排泄性ペプチド (M25297)				
Fwd	GCTGCTTTGGGCAGAAGATAGA	350-371	ラット	
プローブ	CCTCAGCCCGTCACAGCCCAA	394-414		
Rev	GCCAGGAGGTCTTCCTAAAACA	416-437		30

【 0 0 7 2 】

プローブは 5' および 3' の位置を、各々、6 - カルボキシフルオレセインレポーターおよび 6 - カルボキシテトラメチルローダミンクエンチャーで標識した。プライマーおよびプローブの位置は Genbank からの配列に従って注記した。(かっこに受託番号を入れる)。Fwd、順方向；Rev、逆方向。

【 0 0 7 3 】

【表 2】

表 2 10週（肥大、HF無し）、12ないし14（確立されたHFへ進行）、17週（代償された肥大）ラットにおける血流力学パラメーターの比較

パラメーター	10週 (n=8)		12ないし14週 (n=6)		17週 (n=8)	
	SD	Ren-2	SD	Ren-2	SD	Ren-2
LVW/BW	2.15±0.2	3.88±0.08*	2.21±0.5	3.91±0.9*	2.57±0.12	3.60±0.5*
dP/dt _{max}	9010±373	8556±296	9297±221	3764±198*#	7612±124	7814±658
- dP/dt _{max}	8943±976	8200±482	9648±514	3251±312*#	6937±845	6967±654

10

LVW/BW、体重に対して修正した左心室重量；dP/dt_{max} (mmHg/s)、LV圧上昇の最大速度；dp/dt_{min}、LV圧下降の最大速度；*、p<0.05 vs 年齢にマッチしたSDラット#、p<0.01 vs 10-週および17-週Ren-2ラット。

【0074】

【表 3】

表 3：候補遺伝子転写体の半定量的PCRおよびリアルタイム定量的RT-PCRプライマーおよびプローブについての配列

20

遺伝子/プライマー	配列(5' →3')	種
シクロフィリン A (NM_021130)		
Fwd	TGCTGGACCCAACACAAATG	
プローブ	TTCCCAGTTTTTCATCTGCACTGCCA	ヒト
Rev	TGCCATCCAACCACTCAGTC	
ガレクチン-3 (NM_002306)		
Fwd	CTCGCATGCTGATAACAATTCTG	
プローブ	CGGTGAAGCCCAATGCAAACAGAATT	ヒト
Rev	GCAACATCATTCCTCTTTGG	
MCP-1 (M57441)		
Fwd	GCAGGTCTCTGTCACGCTTCT	
Rev	GATGATCCCAATGAGTCGGCT	ラット

30

【0075】

プローブは5'および3'の位置を、各々、6-カルボキシフルオレセインレポーターおよび6-カルボキシテトラメチルローダミンクエンチャーで標識した。プライマーおよびプローブの位置はGenbankからの配列に従って注記した。（かっこに受託番号を入れる）。Fwd、順方向；Rev、逆方向。

40

【0076】

【表 4】

表 4. ガレクチン-3、記載

	N	平均	標準偏差	標準誤差	平均に対する95%信頼区間		最小値	最大値
					下方境界	上方境界		
LVf-f	22	6,253	1,457	,311	5,607	6,899	3,7	8,9
chf	39	9,392	1,845	,295	8,794	9,990	5,0	13,1
infl	15	7,427	1,678	,433	6,498	8,356	4,6	10,5
poscon	3	6,680	,871	,503	4,486	8,824	5,9	7,6
梗塞	6	6,317	1,262	,515	4,992	7,641	5,3	8,5
健康人	26	4,717	1,125	,221	4,262	5,171	2,8	6,8
合計	111	7,169	2,390	,227	6,720	7,619	2,9	13,1

10

【0077】

【表 5】

表 5. ANOVA

	二乗の合計	df	平均二乗	F	Sig.
群間	373,605	5	74,721	30,832	,000
群内	254,464	105	2,423		
合計	628,069	110			

20

【0078】

【表 6】

表 6. 複数比較：従属的変数：ガレクチン-3Bonferroni

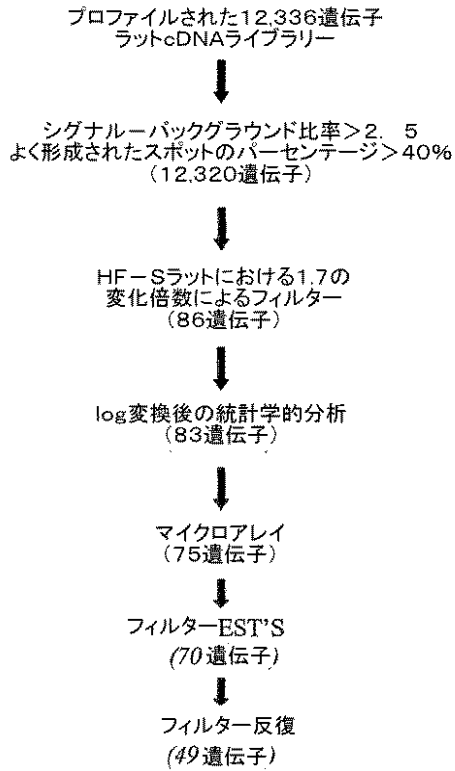
(I) 群	(J) 群	平均差 (I-J)	標準誤差	有意性	95%信頼区間	
					下方境界	上方境界
LVH	chf	-3,139*	,415	,000	-4,385	-1,892
	infi	-1,173	,521	,397	-2,739	,392
	poscon	-,407	,958	1,000	-3,285	2,471
	梗塞	-6,348E-02	,717	1,000	-2,217	2,090
	健常人	1,536*	,451	,014	,182	2,891
chf	LVH	3,139*	,415	,000	1,892	4,385
	infi	1,965*	,473	,001	,544	3,386
	poscon	2,732	,933	,063	-6,994E-02	5,534
	梗塞	3,075*	,683	,000	1,024	5,126
	健常人	4,675*	,394	,000	3,491	5,859
infi	LVH	1,173	,521	,397	-,392	2,739
	chf	-1,965*	,473	,001	-3,386	-,544
	poscon	,767	,985	1,000	-2,191	3,724
	梗塞	1,110	,752	1,000	-1,149	3,369
	健常人	2,710*	,505	,000	1,194	4,226
poscon	LVH	-,407	,958	1,000	-2,471	3,285
	chf	-2,732	,933	,063	-5,534	6,994E-02
	infi	-,767	,985	1,000	-3,724	2,191
	梗塞	,343	1,101	1,000	-2,963	3,650
	健常人	1,943	,949	,647	-,908	4,794
梗塞	LVH	6,348E-02	,717	1,000	-2,090	2,217
	chf	-3,075*	,683	,000	-5,126	-1,024
	infi	-1,110	,752	1,000	-3,369	1,149
	poscon	-,343	1,101	1,000	-3,650	2,963
	健常人	1,600	,705	,380	-,518	3,718
健常人	LVH	-1,536*	,451	,014	-2,891	-,182
	chf	-4,675*	,394	,000	-5,859	-3,491
	infi	-2,710*	,505	,000	-4,226	-1,194
	poscon	-1,943	,949	,647	-4,794	,906
	梗塞	-1,600	,705	,380	-3,718	,518

* 平均の差は0.05レベルにおいて有意である。

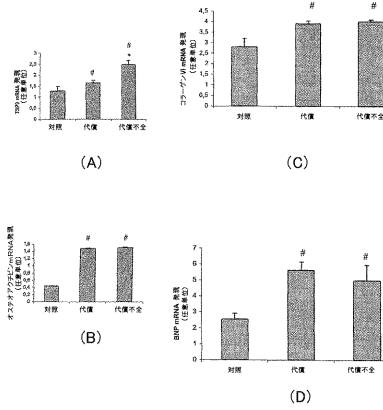
10

20

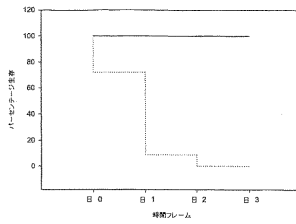
【 図 1 】



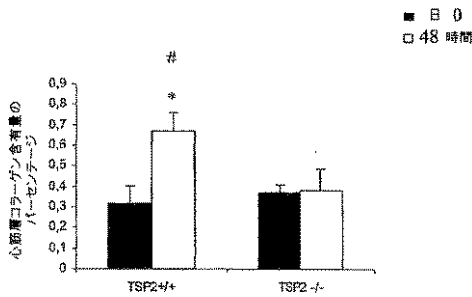
【 図 2 】



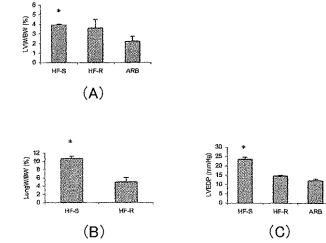
【 図 3 】



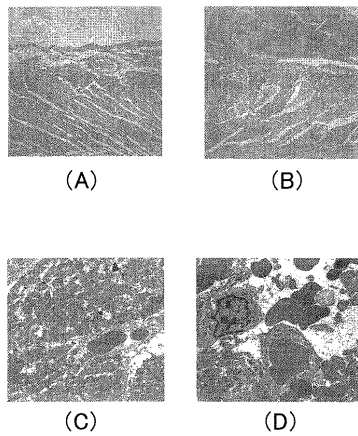
【 図 4 】



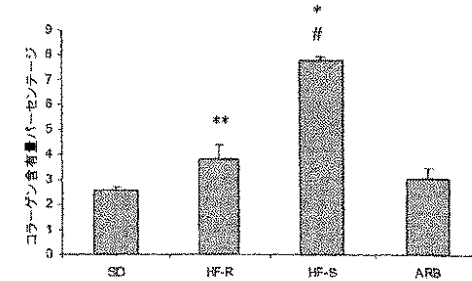
【 図 6 】



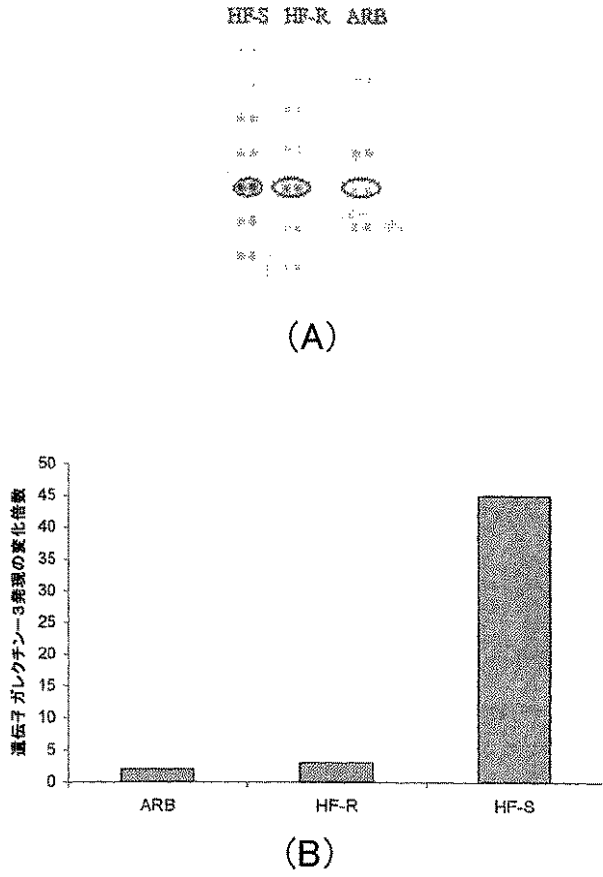
【 図 5 】



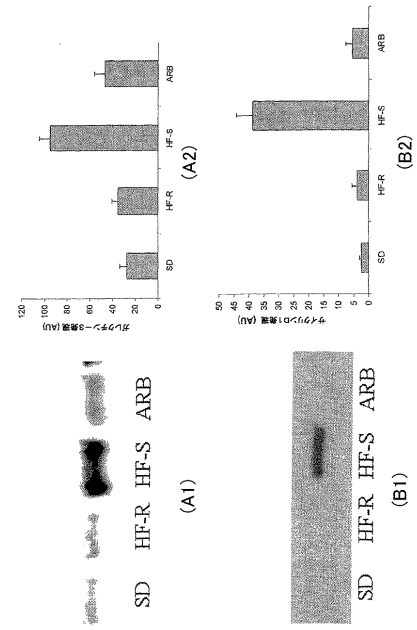
【 図 7 】



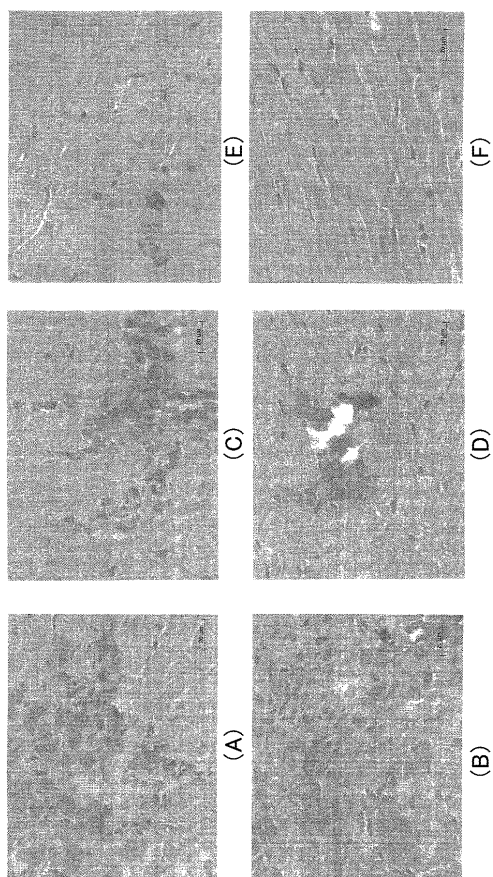
【 図 8 】



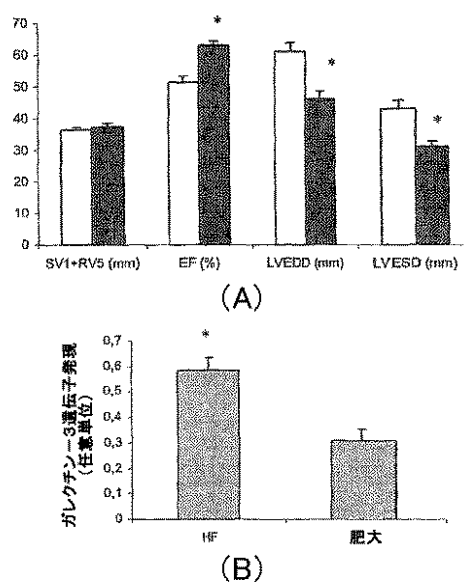
【 図 9 】



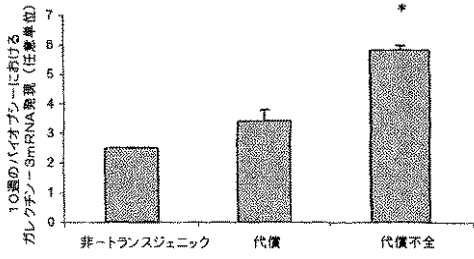
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

2010279378000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	

(72)発明者 イーガル・エム・ピント

オランダ、エヌエル - 6 2 6 7 エーヴェー・カディエル・エン・ケール、ブフヘマスター・ファン・ラールストラート 3 5 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA05 CA09 DA02 HA12 HA15
 4B063 QA01 QA19 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR48 QR55 QR62 QS25
 QS33 QS34
 4C084 AA02 BA44 NA14 ZA36 ZA362 ZA42 ZA422

【外国語明細書】

1

METHOD FOR IDENTIFYING A SUBJECT AT RISK OF DEVELOPING HEART FAILURE BY
DETERMINING THE LEVEL OF GALECTIN-3 OR THROMBOSPONDIN-2

The present invention relates to a method for identifying a subject at risk of developing hypertensive end organ damage, such as congestive heart failure.

Congestive heart failure (HF) is a common but severe and complex clinical syndrome, especially among elderly people, characterized by a diminished cardiac contractile function and decreased exercise tolerance, resulting in a gradual deterioration of the patient often leading to cardiovascular mortality. Thus, a large number of patients die within one to five years after diagnosis. However, although an important number of patients progress to develop life threatening complications, other may remain stable for prolonged periods.

As early identification of patients at risk for developing hypertensive end organ damage, such as heart failure, may prevent rapid progression, it would be preferable to be able to identify those patients in which heart failure is likely to occur before it actually does so. In addition, it would be preferable to be able to identify those patients suffering from heart failure who are at risk for developing severe complications.

Current methods can reliably exclude heart failure, but cannot reliably prove the existence of heart failure, nor can they predict the outcome of established heart failure, or require expensive equipment and specifically trained personnel to do so.

A need therefore exists for a simple and reliable method for predicting the likelihood of onset of heart failure and for predicting the outcome of already established heart failure.

The object of the present invention is to provide a method by which patients can be identified who are at particular risk of developing hypertensive end organ damage, such as heart failure, or who are at particular risk to develop complications of heart failure. After identification, these patients may for example be treated before heart failure or its complications occur, which would be of great clinical importance.

This is achieved by the invention by providing a method for identifying a subject at risk of developing hypertensive end organ damage, comprising the steps of:

- (a) obtaining a biological sample of said subject;
- (b) determining the level of at least one non-myocytical marker in said sample;
- (c) comparing the level of said marker to a standard level; and
- (d) determining whether the level of the marker is indicative of a risk for developing hypertensive end organ damage.

In the research that led to the present invention specific markers were identified that can be used to predict which hypertrophied hearts are prone to failure.

It is generally known that hypertension causes cardiac hypertrophy, which is one of the most important risk factors for heart failure. However, not all hypertrophied hearts will ultimately fail. These observations suggest that additional mechanisms, besides those that cause hypertrophy, are recruited during the progression from compensated cardiac hypertrophy to failure. Although recent studies have reported many molecular and cellular changes underlying cardiac hypertrophy (Lorell BH et al., *Circulation* 102: 470-479, 2000; Panidis et al., *J Am Coll Cardiol.* 3: 1309-1320, 1984),

the additional factors that contribute to heart failure have remained unclear until now.

Boluyt and co-workers have for example documented the upregulation of genes encoding extracellular matrix (ECM) components in spontaneously hypertensive rats (SHR) with heart failure (Boluyt et al., *Cardiovasc Res.* 46: 239-249, 2000; *Hypertension* 30: 1362-1368, 1997; *Cardiovasc Res.* 30: 836-840, 1995; *Eur Heart J.* 16 suppl. N: 19-30, 1995). However, it is not clear whether the overexpression of these genes preceded the overt clinical syndrome of heart failure or whether their overexpression was rather a consequence of an established process of active failure.

Several other unbiased approaches have also been employed to identify mechanisms specific for heart failure (Korstin S et al., *Circ Res.* 92: 715-724, 2003; Hein S et al., *Circulation* 107: 984-991, 2003). In addition, recent studies have suggested that immune mechanisms are specifically activated in failing hearts (Vasan RS et al., *Circulation* 107: 1486-1491, 2003).

However, these previous studies often compare end-stage and drug-treated myocardium with normal myocardium. Therefore, the differences obtained may be secondary to failure and its treatment and such studies thus do not identify the factors that may lead to the failure of a compensated hypertrophied heart which may be used as a marker to identify patients at risk.

In the research that led to the present invention, the gene expression profile of a large number of genes from failing hypertrophied hearts was compared with hypertrophied hearts that had remained compensated. Thus, genes were identified that were differentially expressed in failing versus compensated hypertrophied hearts. In particular, the present invention is based on the finding that particular

non-myocytical genes are abnormally expressed in diseased heart tissue (Example 1 and 2).

According to the present invention use is made of non-myocytical markers. That is, markers that are derived from cells other than cardiac myocytes. This has the advantage that the method of the invention "probes" other processes than the known myocytic changes that occur in stressed myocytes. This opens the opportunity to not only diagnose heart failure, but also to continuously monitor patients with known heart failure, i.e. monitoring whether adverse non-myocytic processes (e.g. inflammation, scarring etc.) occur that may herald major adverse events.

According to the method of the present invention a biological sample is taken from an individual patient. Subsequently, the level of one or more markers in said sample is measured by well-known techniques. Typically, the level is compared with a standard level to determine whether the level of the marker is indicative of the potential of the individual to progress to heart failure. The standard level is based on the level of said marker in healthy subjects. If the level of the marker is elevated compared to the standard level, the subject is at risk for developing CHF or developing complications of heart failure.

The biological sample may be any sample of body fluid, such as blood, plasma, serum, urine etc., or tissue sample such as a cardiac biopsy. According to a preferred embodiment of the invention, however, the biological sample is a plasma sample derived from peripheral blood. Peripheral blood samples can easily be taken from the patients and do not need complex invasive procedures such as catheterization. The biological sample may be processed according to well-known techniques to prepare the sample for testing.

According to a preferred embodiment of the invention, the marker is a protein. The level of proteins can easily be determined by simple and reliable methods, such as immunological methods using specific antibodies against the proteins.

Preferably, the protein is galectin-3, as the level of galectin-3 has been demonstrated to be early and specifically expressed in failure-prone hearts.

According to another preferred embodiment of the invention, the protein is thrombospondin-2. It has been demonstrated that increased cardiac expression of TSP2 identifies those hypertrophied hearts that are prone to progress to overt heart failure.

The level of the markers may be determined by a any well-known suitable method. Preferably, the level of the marker is measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), thus providing a simple, reproducible and reliable method.

The present invention further relates to the use of one or more non-myocytical markers for identifying a subject at risk of developing hypertensive end organ damage, such as congestive heart failure. Several non-myocytical markers may be used according to the invention. Preferably, the marker is galectin-3, and/or thrombospondin-2.

The markers identified according to the present invention may further be used in the prevention and/or treatment of hypertensive end organ damage, in particular for the prevention and/or treatment of congestive heart failure. For example, inhibition of galectin-3 by for example antibodies, and/or activation of TSP-2 by suitable modulators may be beneficial for preventing the occurrence of heart failure. The present invention therefore further relates to the use of galectin-3 and/or modulators thereof for the

manufacture of a medicament for the prevention and/or treatment of hypertensive end organ damage. The invention further relates to the use of thrombospondin-2 and/or modulators thereof for the manufacture of a medicament for the prevention and/or treatment of hypertensive end organ damage.

The present invention is further illustrated by the following Examples and Figures.

Figure 1 is a flow-chart showing the steps for the implementation of previously reported statistical protocols and the comprehensive cutoff points for data mining. Multistep data filtering narrowed the numbers of differentially expressed genes in heart failure susceptible rats down to 49. HF-S, heart failure-susceptible rats; EST's, extended sequence tags.

Figure 2 shows the results of real time PCR to quantify the expression of mRNA transcripts of four selected genes in myocardial biopsies taken from 10-week old rats, (a) TSP2 was significantly overexpressed in those rats that later progressed to rapid cardiac decompensation compared to those that remained compensated for the study period of 17 weeks, (b) Osteoactivin expression, (c) Collagen VI expression, (d) Expression level of brain natriuretic peptide. The data were normalized to the house keeping gene, cyclophilin. Comp, compensated; Decom, decompensated. *, $p < 0.01$ compensated versus decompensated groups; #, $p < 0.05$ SD versus Ren-2 rats; $n = 4$ each group.

Figure 3 shows the percentage survival of mice following induction of myocardial infarction. All the TSP2-null mice (dotted line) died within 72 hours after surgery ($n=16$). Excluding immediate postoperative death, no mortality was observed with wild-type (solid line) mice ($n=22$).

7

Figure 4 is a bar diagram showing the results of the densitometric analysis of myocardial collagen content on day 0 and 48 hours post MI (10 random fields per section). TSP2-null mice failed to mount a reactive fibrosis 48 hours after MI compared to wild-type mice. *, $p < 0.01$, wild-type vs null strains 48 hours post MI; #, $p < 0.01$, day 0 vs 48 hours post MI in wild-type mice.

Figure 5 shows photo- and electron micrographs of the infarcted left ventricular wall. Haematoxyline/Eosin stained section showing intact matrix around the blood vessel with no evidence of interstitial haemorrhage in wild type mice (a). Extensive tissue destruction and interstitial bleeding (*) in TSP^{-/-} mice (b). Electron micrographs from the infarcted left ventricular wall (wild-type strain) (c). Note relatively well maintained vascular and matrix architecture. Sections from TSP2-null mice showed widespread damage of the myocardial matrix and haemorrhage (*) in interstitial areas (d).

Figure 6 shows the haemodynamic parameters of HF-S, HF-R and ARB treated rats. Haemodynamic assessment of Ren-2 transgenic rats with and without ARB (0.05 mg/kg/day candesartan from 7-11 weeks) administration. A, LVW/BW(%), a representative measurement of left ventricular hypertrophy. B, LW/BW(%), indicated the development of congestive heart failure and, C, LVEDP shows the extent of diastolic dysfunction. Both HF-S and HF-R animals had left ventricular hypertrophy. High fibrosis-score animals had higher LW/BW and LVEDP. The parameters were measured before the sacrifice. N=4 each for HF-S and HF-R and 8 for ARB. *, $P < 0.05$ in HF-S vs HF-R and ARB.

Figure 7 shows the results of left ventricular collagen volume fraction analysis of picosirius red stained sections of rat myocardium. The bar diagram shows the

quantification of LV interstitial collagen. 1, control; 2, HF-R; 3, HF-S; 4, ARB. N= 4 -6 each group; #, P < 0.01 vs control; *, P < 0.05 HF-S vs HF-R; **, P <0.05 in HF-R vs SD.

Figure 8 shows a dot blot of differentially expressed genes in Ren-2 rats. Galectin-3 mRNA level was compared among HF-S, HF-R and ARB treated group of rats. Density and diameter of the dots corresponds directly to the level of gene expression compared to SD controls. A, Phospho-imager scanned images from HF-S, HF-R and ARB treated rats respectively. The circled dots represent galectin-3 mRNA expression. B, Bar diagram showing the amount of galectin-3 quantified in densitometric units. N=2, each group and each sample was spotted in duplicates.

Figure 9. Immunoblot for galectin-3, cyclin D1 and E2F-1. Expression levels in rat myocardial homogenates of galectin-3: A1, representative blot; A2, quantification in densitometric units normalized to GAPDH; cyclin D1: B1, representative blot; B2, quantification in densitometric units normalized to GAPDH.

Figure 10 demonstrates the immunohistochemical co-localization of galectin-3, macrophages and MHC-II. Parallel sections obtained from the myocardium of HF-S rats stained with A, anti-galectin-3 mouse monoclonal antibody counterstained with hematoxyline; B, macrophage specific anti-CD68 mouse monoclonal antibody; C, OX-6 mouse monoclonal antibody against MHC-II antigen. A different microscopic field showing dense infiltration of macrophages, D. Macrophage infiltration in HF-R animals was sparsely seen (E), and well preserved myocardial morphology in SD controls, F.

Figure 11. Electro- and Echocardiographic assesment of LVH and HF in human subjects and quantitative real-time PCR to assess myocardial galectin-3 gene expression.

9

A, Left ventricular hypertrophy assessed by Skowlow and Lyon criteria (SV1+RV5 >35 mm). EF of less than 55% is considered a decompensated state. B, Real-time PCR using human galectin-3 probe. Galectin-3 gene expression profiled in human myocardial biopsies. The results were normalized to house-keeping gene, cyclophilin. N=6, *, P < 0.05 HF vs LVH.

Figure 12 shows galectin-3 mRNA expression in 10-week biopsies.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

Thrombospondin-2: increased expression identifies failure-prone cardiac hypertrophy

Cardiac hypertrophy increases the risk of heart failure (HF), but, so far, it has been difficult to predict which hypertrophied myocardium will progress rapidly to HF. According to the present invention it was reasoned that, apart from hypertrophy-related genes, distinct failure-related genes are expressed before failure is apparent, thus permitting molecular prediction of hypertrophied hearts liable to fail. Cardiac gene expression (12,336 clones) of hypertensive homozygous renin-overexpressing (Ren-2) rats that progressed to HF at 12-14 weeks of age, were compared with expression by littermates that remained compensated for 17 weeks. Cardiac biopsies taken at the stage of compensated hypertrophy (10 weeks of age) allowed the inventors to test whether altered expression of identified genes preceded later progression to HF. 49 genes that were overexpressed in the myocardium of HF rats were identified, of which matrix genes comprised the largest group. Thrombospondin-2 (TSP2) was selectively overexpressed only in biopsies from rats that

later progressed to HF, while brain natriuretic peptide (BNP) was, at this early stage, elevated in all rats. To test the effects of absence of TSP2 on the cardiac matrix, myocardial infarction (MI) was induced in TSP2-null mice; this procedure resulted in cardiac rupture in all TSP2-null mice, but in none of the wild type (WT) mice. In conclusion, TSP2 was identified as a novel and crucial regulator of the integrity of cardiac matrix.

Materials and Methods

Transgenic rats and hemodynamic studies

Homozygous Ren-2 rats were obtained from the Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin, Germany. 30 male Ren-2 rats on a Sprague Dawley (SD) background and 9 age-matched SD rats as controls were studied. Of 30 Ren-2 rats, 8 were sacrificed at 10-weeks of age and 8 were treated with 0.05 mg/kg/day of candesartan, an angiotensin II receptor type I blocker (ARB), from 7-13 weeks of age. Of the remaining 14 untreated Ren-2 rats, 6 were sacrificed at 13 weeks upon the development of clinical signs of heart failure and designated as HF-S rats. The remaining 8 Ren-2 rats were closely monitored and were sacrificed at 17 weeks when clinical signs of failure had not yet appeared. These rats were designated as HF-R rats. Hemodynamic parameters were determined before sacrifice and heart, lung and body weight were measured after the sacrifice. The procedure for care and treatment of animals was approved by the institutional animal care committee.

Biopsies from 10-week Ren-2 rats

A second group of 12 Ren-2 and 4 SD rats were anesthetized and the anterior thorax was shaved at the

sternum. The rats were fixed to a hard board on top of a warming pad with the help of self-made loops. A blunt 20-gauge needle was placed in the trachea to serve as a tracheal cannula. The cannula was connected to a volume-cycled rodent respirator (model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA) on room air with a tidal volume of 2.5 to 3 ml and respiratory rate of 80 breaths/min. Further procedures were done with visual help of a micro-dissecting microscope. A 5 mm incision at the left 4th intercostal space was made to access the thorax. After having a clear view of the heart, a biopsy was taken using a custom-made 0.35 mm needle connected to a slowly rotating drill. The whole procedure lasted approximately 15 minutes. Of the 9 Ren-2 rats that survived the operation, 5 developed heart failure between 12-14 weeks of age whereas the remaining four rats stayed compensated until 17 weeks.

RNA isolation and reverse transcription

RNA was isolated from left ventricles with an RNeasy Mini Kit, following the RNeasy Mini Protocol (QIAGEN, Hilden, Germany), and stored at -80°C. The quality of the extract was measured using the Eukaryote Total RNA nano-assay in a 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands). RNA was isolated from 10-week rat heart biopsies with the PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, CA, USA), according to manufacturer's instructions. The RNA was transcribed into cDNA with reverse transcriptase, using 250 ng of random primers (Invitrogen Life Technologies, Breda, The Netherlands).

cDNA microarrays

cDNA clones isolated from a normalized rat cDNA library were chosen for analysis on microarrays using an

Incyte GEM-2/GEM-3 rat cDNA library (total 12,336 genes). PCR-amplified inserts of each cDNA were printed as high-density arrays on treated glass surfaces. Duplicate hybridizations were performed on these array elements with two SD and six Ren-2 rat myocardial mRNAs at 3 different time points. Log transformation of the values was done in order to homogenize the data, and only differences in expression of >1.7 fold were considered differentially expressed. The protocol for data mining and validation was adopted, as detailed previously (Tan et al., Proc Natl Acad Sci. 99: 11387-11392, 2002; Bandman et al., Ann NY Acad Sci., 975: 77-90, 2002).

Sequencing, membrane spotting, and cDNA hybridization for macroarray

Clones of the differentially expressed genes identified by microarray were obtained from Incyte genomics and sequenced with a 5'-GGTGACACTATAGAAGAGC-3' primer (Eurogentec, Seraing, Belgium). After confirming the identity by sequencing, the plasmid inserts were amplified by a PCR reaction with 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTC-3' and 3'-ACGACGGCCAGTGAATTGAA-5' primers. Each clone was then spotted in duplicate on nylon membranes (macroarray). The dot blots were scanned with a personal fx-phospho imager (Cyclone System Packard, Meriden, CO, USA). Individual hybridisation signals were identified and quantified densitometrically using Quantity One, Version 4.2.3 software (BioRad, Munich, Germany). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was selected as a housekeeping gene for internal normalization of the blots.

Bioinformatic analysis

Bioinformatic analysis of the protein sequences translated from 49 HF-specific candidate genes, selected from microarray analysis and multi-step data-mining strategy, was performed. Based on the annotations of their biological functions, three candidate genes, previously not identified in myocardium, and that encode matrix-related proteins, were chosen for further testing by real time PCR.

Primers, probes and real-time PCR

Primers and probes were designed from rat sequences available in GenBank™ using Primer Express Software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Probes were designed from conserved exon splice sites derived from the Ensembl-Mouse Genome Sequencing Consortium and Ensembl-Human Genome Browser, thus preventing recognition by the assay of any potentially contaminating genomic DNA (Table 1). Optimal PCR conditions were found to be 12.5 µl 2x PCR Master Mix for Taqman™ assays, with a final concentration of 5 mM MgCl₂, 300 nM of each primer, 200 nM probe, and 10 ng cDNA-template in a total volume of 25 µl. Amplification and detection were carried out using the ABI Prism 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The PCR data were reported relative to the expression level of the housekeeping gene, cyclophilin A.

Experimental MI and morphometry in TSP2^{-/-} mice

Myocardial infarction was induced in 22 wild-type (129 SvJ strain) and 16 TSP2- null mutant (TSP2^{-/-}) mice by occluding the left anterior descending coronary artery. Two sham-operated mice were used as controls. These mice were killed, after ether anesthesia, by injecting 1 ml 0.1 M CdCl₂ into the vena cava. The heart was perfusion-fixed with 5%

buffered formalin for 10 minutes and immersion-fixed overnight in 10% buffered formalin. Tissue specimens of wild-type and TSP2^{-/-} mice were evaluated using standard electron microscopical techniques. To quantify the extent of fibrosis, computerized planimetry was performed in seven randomly selected fields per section. Each field represented a 400 μm^2 area. Collagen area was quantified selectively from left ventricular interstitium excluding perivascular and epicardial collagen. Collagen area fraction was calculated as the ratio of area stained by picrosirius-red to total myocardial area per field. The details of the procedure have been reported previously (Cherayil et al., Proc Natl Acad Sci USA, 87: 7324-7328, 1990; Cleutjens et al., Am J pathol., 147: 325-338, 1995).

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm SEM. The data for each study group (candesartan-treated and two groups of untreated renin-transgenic rats) were compared using one-way analysis of variances (ANOVA) in combination with a Dunnett post-hoc analysis to correct for multiple comparisons. SD rats were used as an internal control cohort. Analyses were performed using the statistical package SPSS 10.0 (Chicago, IL, USA). P-values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Rapid transition to overt heart failure and death in a subset of Ren-2 rats

Hypertrophied left and right ventricles were noticed in the 8 rats that were sacrificed at 10 weeks and also in other untreated rats that were sacrificed at later dates. No

LVH was noticed in SD controls. Six out of 14 Ren-2 rats on placebo rapidly transitioned towards overt clinical HF between 12 to 14 weeks of age and had depressed cardiac functional indices compared to the 8 rats that remained compensated throughout the observation period of 17 weeks. Pleural effusion and sharp fall in dP/dt_{max} were noted in HF-S rats; these changes were not apparent in HF-R rats (Table 2). Angiotensin II blockade completely prevented the development of cardiac hypertrophy and failure (LV weight/body weight %, 2.52 ± 0.36 , dP/dt_{max} , 8400 ± 202) when evaluated in sacrificed animals at 13 weeks.

Microarray revealed 49 genes overexpressed in heart failure susceptible rats.

For microarray analysis, we first examined biological variability in gene expression between HF-S and HF-R groups. The expression levels of most genes in the two HF-S and HF-R groups were very similar. Out of a total of 12,336 genes profiled for expression, only 49 genes survived the multi-step data mining strategy (Figure 1) and were overexpressed in HF-S rats. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) transhydrogenase was the only gene with reduced expression in failing myocardium. Notably, expression of osteocalcin, TSP2, several pro-collagens and thrombospondin-1 were increased. Many of the identified genes encode proteins with known functions whereas others correspond to genes of unknown function, including novel genes and genes not previously detected in the heart.

Bioinformatic analysis pointed to three novel cardiac matrix-related genes

Since no information was available as to the function of many of the overexpressed genes in HF, we subjected all the 49 genes to bioinformatic analysis. Initially, we made a

broad functional classification of the HF susceptibility genes using GensFIND (Gene Family Identification Network Design) System (<http://www-nhrf.georgetown.edu>), which combines several search/alignment tools to provide rapid and accurate gene family. This strategy indicated that most of the overexpressed genes encode matrix-related proteins. Notably, the functions of 3 selected susceptibility genes (osteoactivin, thrombospondin-2 and collagen VI) were not previously reported in the myocardium.

Macroarray showed normalization of HF susceptibility genes by angiotensin II blockade

To confirm the role of the renin-angiotensin system (RAS) activation in this angiotensin-driven model of heart failure, we re-assessed the expression of the target genes identified by microarray after treating a subgroup of Ren-2 rats with a sub-pressor dose of candesartan from 7 to 13 weeks of age. In addition to improving the hemodynamics, ARB treatment prevented the overexpression of all HF-related candidate genes (data not shown).

Myocardial biopsy at 10 weeks showed TSP-2 upregulation in rats that later rapidly progressed to HF

To evaluate the expression status of the 3 matrix-related genes in the myocardium before HF became hemodynamically and clinically apparent, we developed a technique to obtain cardiac biopsies in the spontaneously beating rat heart. After biopsy, the rat was allowed to recover to determine whether it would prove to be resistant or susceptible to heart failure. This novel approach allowed us to establish the levels of gene expression before failure became apparent. TSP2 expression was significantly increased at the early hypertrophy stage (10 weeks) only in those rats

that developed rapid cardiac decompensation within 12-14 weeks (Figure 2a), while it was not upregulated at this stage in the rats that subsequently remained compensated, nor in non-transgenic control rat hearts. Expression levels of other HF related candidate genes, such as osteoactivin (Figure 2b) and collagen VI (Figure 2c), were increased in the early hypertrophy stage both in the rats that later failed, and in those that remained compensated compared to controls. Importantly, the widely used marker of cardiac hypertrophy and failure, was upregulated in the 10-week biopsy in all rats irrespective of later compensation or failure and could therefore not distinguish failure-prone from failure-resistant rats (Figure 2d). In accordance with our initial microarray studies, expression of these 3 genes further increased to more than 2-fold of their 10-week expression levels upon the development of heart failure. Compensated rats, despite having high osteoactivin, collagen VI, and BNP at 10 weeks, had no further significant increase in the expression levels of these genes upon the sacrifice at 17 weeks (data not shown).

TSP-2 knock out (TSP^{-/-}) mice cannot survive acute myocardial infarction

In contrast to various rat models of heart failure, there are no carefully documented mouse models that consistently develop heart failure in response to pressure overload. Therefore, we infarcted the anterior myocardium in 22 wild-type and 16 TSP2^{-/-} mice to address the biological role of TSP2 in acute myocardial structural damage and consequently, rapid cardiac remodelling. Infarction was not tolerated by TSP2-null mice, since all mice died from cardiac rupture within the first 72 hours after MI. On the other hand, 100% of the wild-type mice that did not succumb to

immediate post-operative complications survived (Figure 3). Computerized morphometry, 48 hours post-MI, showed an apparent complete lack of reactive increase in myocardial collagen in TSP2-null compared to wild-type mice ($0.38 \pm 0.05\%$ and $0.70 \pm 0.04\%$, respectively; $p < 0.05$) (Figure 4). Light and electron microscopy revealed extensive disruption of myocardial matrix in TSP2-null mice. None of the wild-type mice demonstrated this phenotype (Figure 5).

Discussion

It was demonstrated in this study that increased cardiac expression of TSP2 identifies those hypertrophied hearts that are prone to progress to overt heart failure. It was further shown that TSP2 is required to mount an effective response to acute cardiac loading. In contrast, known markers of hypertrophy like BNP were invariably increased in all forms of cardiac hypertrophy and therefore could not distinguish between failure-prone and failure-resistant forms of hypertrophy.

Although the family of thrombospondins has been studied extensively in vascular and thrombotic diseases, there are no reports that substantiate an important role for thrombospondins in heart failure. Our findings suggest that TSP2 may perform, directly or indirectly, a crucial function in cardiac matrix biology.

TSP2 is a secreted matricellular glycoprotein whose functions are diverse and incompletely understood. Since no close orthologues of TSP2 were found in the genomes of Caenorhabditis elegans or *Drosophila*, it appears that this protein has evolved to cope with the increased complexity of cell-matrix interaction in vertebrates. As evidence for a role of TSP2 in the organization of the extracellular matrix, previous studies in TSP2-null mice have shown that loss of

TSP2 expression results in abnormally large collagen fibrils with irregular contours. Furthermore, the skin of TSP2- null mice is fragile and has reduced tensile strength. TSP2-null skin fibroblasts are defective in their attachment to a substratum and have increased levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in their culture. The current study has identified two, apparently contradictory, functions for TSP2 in the myocardium. In chronic hypertension in Ren-2 rats, increased cardiac expression of TSP2 identifies those animals that are prone to heart failure. While this response would appear to indicate that expression of TSP2 is detrimental, it is likely that the response reflects a heightened, previously activated, injury response in rats that later progress to overt failure, in comparison with the response in rats that remained compensated for a prolonged period of time. It is well established that the expression of TSP2 is characteristic of the response to injury in adult animals. On the other hand in experimental myocardial infarction in mice, the presence of TSP2 clearly protects against cardiac rupture. While the two experimental systems are difficult to compare because different species are involved and, in the case of TSP2-null mice, complex compensatory changes are likely to be present, both sets of results are consistent with an important role for TSP2 in generating a fully functional extracellular matrix after an injury. In the case of excisional skin wound healing in TSP2-null mice, the absence of TSP2 appears to be beneficial because in this particular form of wound healing the resulting increase in angiogenesis and in MMP2 accelerate healing, despite the pre-existing structural changes in collagen fibers that are known to be present in this tissue. However, it is suggested that the prior intrinsic weakness of cardiac tissue, due to similar abnormalities in the matrix of

the myocardium, predispose to cardiac rupture after infarction.

The present data suggest that increased cardiac expression of TSP2 precedes progression to failure. Since it is known that thrombospondins can bind to integrins it is possible that TSP2 mediates pro-fibrotic effects via integrin signaling. Recently Zhang et al. (J Clin Invest 111: 833-841, 2003) reported that mice with haploinsufficiency of the adaptor protein gene, *Grb2*, are resistant to cardiac fibrosis in response to pressure overload. Grb2 is recruited in integrin-mediated activation of focal adhesion kinase that can result from mechanical stress. In our study we found that $\beta 1$ integrin was among the genes whose expression was clearly increased in the hearts of hypertensive Ren2 rats and was further increased in failing hearts. This finding was substantiated by our recent observation that the stretching of cardiac fibroblasts in vitro increased protein levels of $\beta 1$ integrin (S. Pokharel and Y.M. Pinto, unpublished data).

It should be noted that the picosirius red staining technique for quantification of collagen relies on the size, alignment, and packing of collagen fibres to show visible polarization of orange-red colour. Since TSP2-null mice have an abnormal collagen fibril and fiber structure, specifically less organized fibers and irregular and larger fibrils, the birefringence that was measured could have been affected by these changes.

In conclusion, according to the present invention it is proposed that TSP2 functions as a crucial regulator of the integrity of the cardiac matrix. Since increased extracellular matrix formation characterizes both experimental and clinical forms of pressure overload-induced heart failure, the early expression of TSP2 may reflect a matrix response that is crucial in the transition from

compensated hypertrophy to heart failure. These observations show that early detection of cardiac overexpression of TSP2 can identify those hypertrophied hearts that are susceptible to heart failure, and may facilitate early identification and possibly treatment of patients that are prone to progress to heart failure.

EXAMPLE 2

Galectin-3 Marks Activated Macrophages in Hypertrophied Hearts Prone to Failure

The increased myocardial expression of macrophage chemo-attractant proteins and various cytokines has suggested that macrophages are involved in heart failure (HF). However, it is unclear whether macrophages merely respond to already established injury, or are actively involved in the early stages of HF. To study these mechanisms in hypertensive HF, the inventors employed homozygous hypertensive TGR(mRen2)²⁷ (Ren-2) rats. These rats invariably develop cardiac hypertrophy by the age of 10 weeks, whereafter some remain compensated up to 17 weeks, while others progress to failure and death around age 12-14 weeks. This study shows that cardiac galectin-3 expression specifically marks hypertrophied hearts prone to progress to failure. Macrophages appear to be activated early and specifically in failure prone hypertrophied hearts and macrophage derived mediators like galectin-3 may contribute to the development of cardiac fibrosis and progression towards HF.

Materials and methods

Transgenic rats and hemodynamic studies

Homozygous Ren-2 rats were obtained from the Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin, Germany. We studied 16 male Ren-2 rats and 8 age-matched controls from the non-transgenic background, Sprague Dawley (SD) rats. Of the 16 Ren-2 rats, 8 were treated with 0.05 mg/kg/day of candesartan, an angiotensin II receptor type I blocker (ARB), from 7-13 weeks of age. Within 8 untreated Ren-2 rats, 4 were sacrificed at 13 weeks upon the development of HF. The remaining 4 Ren-2 rats were monitored and were sacrificed at 17 weeks when signs of clinical failure had not appeared. Hemodynamics was taken at 10 weeks and before sacrifice. Heart, lung and body weight were measured after the sacrifice. The procedure for care and treatment of animals was approved by the institutional animal care committee.

Myocardial biopsies from 10-week Ren-2 rats

A second group of 12 Ren-2 and 4 SD rats were anesthetized and a blunt 20-gauge needle was placed in the trachea to serve as a tracheal cannula, which was connected to a volume-cycled rodent respirator (model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA) on room air with a tidal volume of 2.5 to 3 ml and respiratory rate of 80 breaths/min. With the visual help of a micro-dissecting microscope, a 5 mm incision at the left 4th intercostal space was made to access the thorax. Biopsy was taken using a custom-made 0.35 mm needle.

cdNA microarrays

cdNA clones isolated from a normalized rat cdNA library (total 12,336 genes) were chosen for analysis on

microarrays (Incyte Genomics, CA, USA, rat GEM-2/3). PCR amplified inserts of each cDNA were printed as high-density array on glass surfaces. Duplicate hybridizations were performed on these glass chips with two SD and six Ren-2 rat myocardial mRNA at three different time points. The target genes that showed statistically significant ($P < 0.001$) changes in expression with at least 2-fold overexpression in HF-S group were reprinted onto a sub-array for further analysis so that the genes were independently assessed four times to improve the level of reliability. The protocol for data mining (Tan FL et al., Proc Natl Acad Sci., 99: 11387-11392, 2002) and validation was adopted, as detailed previously (Bandman O et al., Ann NY Acad Sci. 975: 77-90, 2002).

Primers and probes

Primers (forward, 5'-CCCGACTGGACCACTGACA-3', reverse, 5'-CAGCATGCGAGGCATGACT-3' and probe, 5'-TGCCCTACGATATGCCCTTGCCCTG-3') specific to galectin-3 were designed from sequences available in GenBank™ using Primer Express Software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

RNA isolation and real time PCR

RNA was isolated from rat left ventricle with the RNeasy Mini Kit following the RNeasy Mini Protocol (QIAGEN, Hilden, Germany) and stored at -80°C . RNA was isolated from rat heart biopsies with the FicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Optimal PCR conditions were found to be 12.5 μM 2x PCR Master Mix for Taqman™ assays with final concentration of 5 mM MgCl_2 , 300 nM of each primer, 200 nM probe and 10 ng cDNA-template in a total volume of 25 μl .

Sequencing, membrane spotting and cDNA hybridization for macroarray

Clones of the differentially expressed genes identified by microarray were obtained from Incyte genomics and sequenced with 5'-GGTGACACTATAGAAGAGC-3' primer (Eurogentec, Seraing, Belgium). After confirming the identity, the plasmid inserts were amplified by PCR reaction with the 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTC-3' and 3'-¹ ACCACGGCCAGTGAATTGAA-5' primers. Each clone was then spotted in duplicates on nylon membrane (macroarray). The dot blots were scanned with the personal fx-phospho imager (Cyclone System Packard, Meriden, CO, USA).

Protein isolation and Western blotting

Protein isolation and Western blotting was performed as described previously⁹. Primary antibodies (Galectin-3, Bioreagents; ED-1 and OX-6, a kind gift from Dr. M. de Winther, Department of Molecular Genetics, University of Maastricht, The Netherlands) were diluted 1/1000 in tris-buffer saline with tween-20 (TBS-T). Secondary antibody (horseradish-peroxidase conjugated IgG, Cell Signaling Technology) was diluted 1/2000 in TBS-T. Protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL, USA) according to manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry, galectin cytochemistry and confocal microscopy

The expression of galectin-3 and accessible binding sites were visualised by a specific anti-galectin-3 monoclonal antibody and biotinylated galectin-3, as described previously (Gabijs et al., Anal Biochem.: 189: 91-94, 1990). As detailed elsewhere (Andre et al., Chembiochem. 2:

822-830, 2001) galectin-3 was biotinylated under activity-preserving conditions. In confocal laser scanning microscopy, galectin binding sites were detected by FITC-labelled avidin. A Texas-red labelled secondary antibody was used to visualise immunocytochemically the proliferating nuclear antigen (PCNA). Further details on the procedure are available elsewhere (Broers et al., *J Cell Sci.*: 112 (Pt 20): 3463-3475, 1999).

Cardiac fibroblast proliferation and proline incorporation assays

Rat cardiac fibroblasts were isolated from 2-day-old neonatal Sprague-Dawley rats, as described previously (Pokharel et al., *Hypertension*, 40: 155-161, 2002). Cells were cultured in Dulbecco's modification of eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), along with 1% L-glutamate, 50 U/mL penicillin, and 0.1 g/L streptomycin, and were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Twenty-four hours after seeding, cells were made quiescent by incubation with media containing 0.5% FBS for 24 hours. Cells were then treated with murine recombinant galectin-3 (control, 10µg/ml and 30µg/ml) for 24 hours. The number of dividing cells was determined by radio-labelled methyl- [³H] thymidine incorporation (0.5µCi per well) assay. Radioactivity was measured in the mixture of fibroblasts and scintillation liquid using LKB-Wallace beta counter (FSA Laboratory Supplies, Loughborough, UK). Secreted collagen was measured using a [³H]proline incorporation assay. Briefly, cardiac fibroblasts were seeded in 6-well plates at 90-100% confluency. During the final 24 hours of incubation, 15µCi/ml of L-[³H]proline was added. Incorporated [³H]proline from the condition medium was

precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA) and counted with the scintillation counter.

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm SEM. The data for each study were compared using one-way analysis of variances (ANOVA) in combination with a Dunnett post-hoc analysis to correct for multiple comparisons, using SD rats as internal control cohort. Analyses were performed using the statistical package SPSS 10.0 (Chicago, IL, USA). P-values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Deteriorated cardiac function and cardiac fibrosis in HF-S rats

Hypertrophied left and right ventricles in 8 placebo-treated rats were observed. In contrast, there was no increase in LV in candesartan treated rats and non-transgenic controls. Four out of 8 rats without treatment developed overt clinical HF between 12-14 weeks of age, which was accompanied by indices of depressed cardiac function. The remaining 4 rats remained compensated during the study period of 17 weeks. Overt HF with pleural effusion (lung weight/body weight %: HF-S, 10.61 ± 0.7 vs HF-R, 4.97 ± 0.2 , $P < 0.001$) and elevated left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) was apparent in HF-S rats, which was not present in HF-R and or ARB treated rats (Figure 6 a, b and c). At 10 weeks all the placebo-treated Ren-2 rats had LVH but no haemodynamic evidence for decompensation (LV weight/body weight %: Ren-2, 3.88 ± 0.08 vs non-transgenic controls 2.15 ± 0.2 , and dp/dt_{max} : Ren-2, 8556 ± 296 vs non-transgenic controls 8780 ± 373). Myocardial collagen content, determined by computer-assisted

densitometry, revealed higher degree of cardiac fibrosis in the HF-S rats compared to HF-R rats. ARB normalized LVH and myocardial collagen content so that it remained comparable to that of the normotensive background strains (figure 7).

Microarray reveals abundance of immune-related genes in HF susceptible rats

Firstly, we examined the biological variability in gene expression between HF-S and HF-R groups. The expression levels of most genes between pairs of samples from both groups were highly correlated. We focused on the differentially expressed genes between the failing and non-failing hypertrophied hearts. Log transformation of the values was done and only statistically significant ($P < 0.05$) differences in expression levels exceeding the 2-fold threshold were considered to be differentially expressed. Galectin-3 emerged as the most prominently overexpressed gene with more than 5-fold rise in HF rats (Table 3). Of interest, major histocompatibility complex antigen II (MHC-II) and immunoglobulin receptors genes were among these overexpressed genes.

Macroarray reveals normalization of HF susceptibility genes by angiotensin II blockade

To validate the differentially expressed genes in HF, we first confirmed the identity of the clones by sequencing and consequently re-spotted these genes onto nylon membrane (macroarray) for repeat hybridization in separate biological samples. This also yielded an overexpression of seven major index genes initially identified by microarray. To confirm the role of renin-angiotensin system (RAS) activation in this angiotensin driven model of HF, we re-assessed the expression of the target genes identified by microarray after treating a

subgroup of Ren-2 rats with a subpressor dose of candesartan from seven till 13 weeks of age. Angiotensin II blockade completely prevented the development of cardiac hypertrophy and failure. On the level of gene expression, it prevented the overexpression of all HF-related candidate genes. Notably, galectin-3 gene expression was also prevented.

Western blotting shows high galectin-3 expression in failing myocardium

Given the robust transcriptomal increase in galectin-3, we focused on its protein levels in the myocardium. Comparable to the results obtained in micro/macroarrays, the highest level of galectin-3 expression was observed in the same group of animals that had highest degree of cardiac fibrosis and rapidly developed cardiac decompensation by 13 weeks (HF-S, 94.6 ± 8.9 ; HF-R, 35 ± 5.6 ; $P < 0.01$) (Figure 8 a and b).

Co-localization of CD68 positivity, MHC-II antigen and galectin-3

We monitored the distribution of galectin-3 in the rat myocardium by immunohistochemistry. Histologically, HF susceptible rats revealed patchy areas of and fibrosis. The architecture of the tissues in non-affected areas was well preserved. In contrast, these areas of high fibrosis were not seen in ARB treated and SD rats, and also not in hypertrophied non-failing HF-R rats. Importantly, galectin-3 positive areas showed pronounced tissue damage and high level of fibrosis. Morphologically, galectin-3 positive cells were rather large. To confirm the assumption that these cells were macrophages, we analyzed the serial sections with a macrophage specific antibody (ED-1). Galectin-3 positive areas co-localized with the macrophage specific staining.

These macrophages strongly expressed MHC-II antigen too, indicating an active role of these cells in antigen presentation. These characteristics were not evident in HF-R rats and non-transgenic controls.

Galectin-3 binding sites in cardiac fibroblasts

Having defined strong expression of galectin-3 in macrophages, we determined whether galectin-3 binds to cardiac fibroblasts. We used the biotinylated galectin-3 to visualize galectin-3 binding sites on cardiac fibroblasts. In 0.1% Triton-permeabilised cells, presence of galectin-3 binding sites resulted in diffuse cytoplasmic as well as perinuclear staining in resting cells (Figure 10 a). In contrast, proliferating fibroblasts showed enhanced staining around the nucleus, revealing a mitosis-related alteration in staining profile (Figure 10 b). This pattern was independently monitored by confocal microscopy. In fact, these experiments confirmed compact presence of accessible galectin-3 ligands around the nucleus in proliferating (i.e., PCNA positive) cardiac fibroblasts (Figure 10 c, d and e) evocative of reflecting cell cycle activation in galectin-3 overexpressed state.

Galectin-3 induced fibroblast proliferation and collagen production

Having thus provided evidence for presence of accessible sites in the cardiac fibroblasts, we determined whether galectin-3 stimulates the growth of cardiac fibroblasts. Using recombinant galectin-3, we performed proliferation assays. Galectin-3 was added in different concentrations (0, 10 and 30 $\mu\text{g/ml}$) with and without serum enrichment. We observed significant increase in cardiac fibroblast proliferation with 10 and 30 $\mu\text{g/ml}$ exogenous

30

galectin-3 over 24 hours (galectin-3 at 30 $\mu\text{g/ml}$, 347 ± 17.5 counts per minute (cpm); galectin-3 at 10 $\mu\text{g/ml}$ 309 ± 4.8 cpm; control, 145 ± 4.8 ; $p < 0.01$). We then monitored the collagen production by cardiac fibroblasts with the addition of exogenous galectin-3 using radioactive proline-incorporation assays. With 30 $\mu\text{g/ml}$ of galectin-3 in the medium, the proline incorporation increased by approximately 66% (galectin-3 at 30 $\mu\text{g/ml}$, 1066 ± 56 cpm; control, 707 ± 52.8 cpm; $p < 0.05$). Lower concentration of galectin-3 failed to produce significant effects (galectin-3 at 10 $\mu\text{g/ml}$ 992 ± 72 cpm; $p = 0.13$).

Myocardial biopsy at 10 weeks showed high galectin-3 expression in rats that later rapidly progressed to HF

To evaluate the expression status of galectin-3 in the myocardium before HF became hemodynamically and clinically apparent (i.e., 10 weeks of age) we developed a technique to obtain cardiac biopsies in the spontaneously beating rat heart. After biopsy, the rat was allowed to recover to determine whether it would prove to be resilient or rather susceptible to HF. Measured by real-time PCR, myocardial expression of galectin-3 gene was increased only in the rats that later progressed to HF (arbitrary units, 5.8 ± 0.17), while it was expressed at relatively lower levels in the rats that subsequently remained compensated (3.4 ± 0.2), and in non-transgenic control rat hearts (2.5 ± 0.033) (Figure 12).

Discussion

The current study aimed to identify the mechanisms recruited specifically in the hypertrophied ventricles transited to failure. We demonstrated that galectin-3, a macrophage expressed protein, is early and specifically

expressed in failure-prone hypertrophied hearts. Furthermore, we establish that galectin-3 binds to intracellular binding sites in cardiac fibroblasts and activates cardiac fibroblast proliferation and collagen production, suggesting that this can contribute to myocardial stiffness and probably progression towards HF.

Previous studies have suggested a role for macrophages and inflammatory responses in HF. These studies, however, have left the question unanswered whether macrophage activation preceded or merely accompanied HF. Furthermore, an explanation on the specific mechanisms that link macrophages to cardiac fibrosis was also lacking.

Identified first as an antigen on the surface of peritoneal macrophages, galectin-3 is the only chimera-type member of the galectin family. It has a lectin group sharing calcium-independent specificity to β -galactosides as well as proteins and is located in the phagocytic cups and phagosomes of the macrophages. Besides its anti-apoptotic and growth promoting actions, galectin-3 also regulates monocyte chemotaxis, chemokinesis and modulates the availability of cytokines. Furthermore, recent studies have also suggested that galectin-3 plays a critical role in phagocytosis by macrophages when cross-linked by Fc γ receptor (Fc γ R).

Interestingly, we also observed the overexpression of Fc γ R in our HF models (Table 3).

The biopsy obtained from 10-week old rats showed an increased galectin-3 expression only in the rats that transitioned to rapid failure. Given the pro-inflammatory and fibroblast growth promoting actions of galectin-3, the increased expression at this stage may contribute to a failure-conducive environment. In accordance with our findings, galectin-3 expressed by liver-analogues of macrophages (i.e., kupffer cells), have been implicated to

induce the synthesis of excess fibril-forming collagens in liver. This suggests that galectin-3 is a macrophage related pro-fibrotic mediator and yet another inflammatory infiltrate cytokine with the potential to influence cardiac remodeling in conditions characterized by macrophage infiltration. An alternative hypothesis on how galectin-3 could add to the progression towards HF emerges from the discovery of galectin-3 as the third receptor for advanced glycosylation end-products (AGE-3), that have critical role in collagen cross-linking and myocardial stiffness.

We also document that galectin-3 binds to intracellular receptors and induces cardiac fibroblast proliferation and accentuates collagen production. Though originally discovered as a carbohydrate binding protein, galectin-3 is known to specifically interact with intracellular targets besides glycoconjugates. Previous studies have proposed several molecules as galectin-3 binding sites including, Mac-2 binding protein, and laminin. However, it is still not known what induces the rapid perinuclear migration of galectin-3 binding elements in proliferating cells. Whether it is an export of galectin-3 binding sites from the dividing nucleus (*centrifugal migration*) or it is a directed cytosolic to nuclear transition (*centripetal migration*) of these receptors, needs further exploration.

The current study suggests a key role for immune system activation and galectin-3 production in the progression from left ventricular hypertrophy to HF and demonstrates a link between pro-immune and pro-fibrotic factors. The increased expression of galectin-3 preceding HF can reflect the early and aberrant activation of macrophages in hypertrophied failing ventricles. Galectin-3, in turn, can relay signals from activated macrophages to cardiac fibroblasts. Peripheral detection of galectin-3 can serve as

a predictor of HF and therapeutic inhibition of galectin-3 action can become a novel therapeutic target to counteract excess cardiac fibrosis.

EXAMPLE 3

Evaluation of galectin-3 in human serum

Galectin-3 levels were measured in the serum of patients with cardiovascular disease. A commercially available kit to measure galectin-3 by ELISA was employed. The results are summarized in Table 4-6. It was shown that Galectin-3 is significantly elevated in the serum of patients with cardiovascular disease such as heart failure, LVH. Moreover, an upper limit for galectin-3 levels in healthy control subjects was found, which is surpassed in most CHF patients.

According to the present invention it has thus for the first time been demonstrated that measurement of galectin-3 in the serum of human subjects reliably distinguishes diseased from non-diseased subjects, and thus provides additional information on non-myocytic disease processes, in conjunction with known myocytic markers (BNP).

Data tables:

LVH= hypertensives, hypertrophy

CHF = heart failure

Infl = inflammatory vascular disease

Poscon= mixed group of diseases

Infarct= infarction patients

Healthy = healthy controls

Table 1. Sequences of real-time quantitative RT-PCR primers and probes of candidate gene transcripts

Gene/primer	Sequence (5'→3')	Position	Species
Cyclophilin A (M19533)			
Fwd	GGGAGAAAGGATTGGCTATAAGG ✓	167-190	Rat
Probe	TGAAGTCACCACCCCTGGCACATGAAT ✓	219-244	
Rev	GCCACCAGTGCCATTATGG ✓	249-267	
Thrombospondin 2 (XM_214778)			
Fwd	GAAATGGTCTACTTCTCAGACCTCAAG ✓	603-629	Rat
Probe	CCCTGCTCTTAGGCACTCTGCACTCAT ✓	631-659	
Rev	GCACACTGCTGGAGCTGGA ✓	791-809	
Osteoactivin (NM_002510)			
Fwd	GGACTTCATTGTGACCTGCAAA ✓	1350-1371	Rat
Probe	CCACTCCCACGGAAGCCTGTACGAT ✓	1376-1400	
Rev	ACCCTGTCTTGGGCGAICT ✓	1421-1439	
Collagen VI (TC322135)			
Fwd	CCCTCCTTGCAGGCAGAAC ✓	816-834	Rat
Probe	ATGCCTTGACAGATCAATAACACAGCAGTAGG ✓	845-875	
Rev	CAGGAGGACCGAGAGCTCAT ✓	897-916	
Brain natriuretic peptide (M25297)			
Fwd	GCTGCTTTGGGCAGAAGATAGA ✓	350-371	Rat
Probe	CCTCAGCCCGTCACAGCCCAA ✓	394-414	
Rev	GCCAGGAGGTCTTCCTAAAACA ✓	416-437	

The probes were labelled at the 5' and 3' positions with 6-carboxyfluorescein reporter and 6-carboxytetramethylrhodamine quencher, respectively. The position of the primers and probes were annotated according to the sequences derived from GenBank (accession numbers given in parenthesis). Fwd, forward; Rev, reverse.

Table 2. Comparison of hemodynamic parameters at 10-week (hypertrophy, no HF), 12 to 14-week (progressed to established HF) and 17-week (compensated hypertrophy) rats

Parameters	10 weeks (n=8)		12-14 weeks (n=6)		17 weeks (n=8)	
	SD	Ren-2	SD	Ren-2	SD	Ren-2
LVW/BW	2.15±0.2	3.88±0.08*	2.21±0.5	3.91±0.9*	2.57±0.12	3.60±0.5*
dP/dt _{max}	9010±373	8556±296	9297±221	3764±198*#	7612±124	7814±658
-dP/dt _{max}	8943±976	8200±482	9648±514	3251±312*#	6937±845	6967±654

LVW/BW, left ventricular weight corrected for body weight; dP/dt_{max} (mmHg/s), maximum rate of LV pressure rise; -dP/dt_{min}, maximum rate of LV pressure fall; *, P < 0.05 vs age matched SD rats; #, P < 0.01 vs 10-week and 17-week Ren-2 rats.

Table 3. Sequences for semi-quantitative PCR and real-time quantitative RT-PCR primers and probes of candidate gene transcripts

Gene/primer	Sequence (5'→3')	Species
Cyclophilin A (NM_021130)		
Fwd	TGCTGGACCCAACACAAATG	Human
Probe	TTCACAGTTTTTCATCTGCACTGCCA	
Rev	TGCCATCCAACCACTCAGTC	
Galectin-3 (NM_002306)		
Fwd	CTCGCATGCTGATAACAATTCTG	Human
Probe	CGGTGAAGCCCAATGCAAACAGAATT	
Rev	GCAACATCATTCCTCTTTGG	
MCP-1 (M57441)		
Fwd	GCAGGTCTCTGTACAGCTTCT	Rat
Rev	GATGATCCCAATGAGTCGGCT	

The probes were labelled at the 5' and 3' positions with 6-carboxyfluorescein reporter and 6-carboxytetramethylrhodamine quencher, respectively. The position of the primers and probes were annotated according to the sequences derived from GenBank (accession numbers given in parenthesis). Fwd, forward; Rev, reverse.

Table 4. Galectin-3, descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
LVH	22	6,253	1,467	,311	5,607	6,899	3,7	8,8
chf	39	9,392	1,845	,295	8,794	9,990	5,0	13,1
inf	15	7,427	1,678	,433	6,498	8,356	4,6	10,5
poscon	3	8,660	,871	,503	4,496	8,824	5,9	7,6
infarct	6	6,317	1,262	,515	4,992	7,641	5,3	8,5
healthy	26	4,717	1,125	,221	4,262	5,171	2,8	6,8
Total	111	7,169	2,390	,227	6,720	7,619	2,8	13,1

Table 5. ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	373,605	5	74,721	30,832	,000
Within Groups	254,464	105	2,423		
Total	628,069	110			

Table 6. Multiple comparisons. Dependent variable: Galectin-3
Bonferroni

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LVH	chf	-3,139*	,415	,000	-4,385	-1,892
	infi	-1,173	,521	,397	-2,739	,392
	poscon	-,407	,958	1,000	-3,285	2,471
	infarct	-6,348E-02	,717	1,000	-2,217	2,090
	healthy	1,536*	,451	,014	,182	2,891
chf	LVH	3,139*	,415	,000	1,892	4,385
	infi	1,865*	,473	,001	,544	3,386
	poscon	2,732	,933	,063	-6,994E-02	5,534
	infarct	3,075*	,683	,000	1,024	5,126
	healthy	4,675*	,394	,000	3,491	5,859
infi	LVH	1,173	,521	,397	-,392	2,739
	chf	-1,965*	,473	,001	-3,386	-,544
	poscon	,767	,985	1,000	-2,191	3,724
	infarct	1,110	,752	1,000	-1,149	3,369
	healthy	2,710*	,505	,000	1,194	4,226
poscon	LVH	-,407	,958	1,000	-2,471	3,285
	chf	-2,732	,933	,063	-5,534	6,994E-02
	infi	-,767	,985	1,000	-3,724	2,191
	infarct	,343	1,101	1,000	-2,963	3,650
	healthy	1,943	,949	,647	-,908	4,794
infarct	LVH	6,348E-02	,717	1,000	-2,090	2,217
	chf	-3,075*	,683	,000	-5,126	-1,024
	infi	-1,110	,752	1,000	-3,369	1,149
	poscon	-,343	1,101	1,000	-3,650	2,963
	healthy	1,600	,705	,380	-,518	3,718
healthy	LVH	-1,536*	,451	,014	-2,891	-,182
	chf	-4,675*	,394	,000	-5,859	-3,491
	infi	-2,710*	,505	,000	-4,226	-1,194
	poscon	-1,943	,949	,647	-4,794	,908
	infarct	-1,600	,705	,380	-3,718	,518

*. The mean difference is significant at the .05 level.

SEQUENCE LISTING

<110> Universiteit Maastricht

<120> Method for identifying a subject at risk of developing heart failure by determining the level of galectin-3 or thrombospondin-2

<130> P228430

<140> PCT/EP2004/010879

<141> 2004-09-27

<150> EP 03078161.1

<151> 2003-10-09

<160> 29

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 1
 ggtgacacta tagaagagc 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' primer

<400> 2
 accatgaita cggcaagtc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' primer

<400> 3
 acgaagccca gtgaattgaa 20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> forward primer

<400> 4
 cccgactgga ccaotgaaa 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> reverse primer

<400> 5
cagcatgcca ggcatgact 19

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> probe

<400> 6
tgcctacga tatgacctg cctg 24

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 7
ggagaaagg atttgggat aagg 24

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> probe

<400> 8
tgaaatcacc accctggcac atgaat 26

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 9
gccaccagtg ccattatgg 19

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 10
gaaatggtct accttcaga cctcaag 27

<210> 11
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> probe

<400> 11
cctctctctc tagcatctc tgcactcat 29

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 12
gcaactgct ggagctgga 19

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 13
ggaattcatt gtgaactgca aa 22

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> probe
<400> 14
ccactcccac ggaagcotgt acgat 25

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 15
accctgttc tggcgatct 20

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 16
ccctccttgc aggcagaac 19

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> probe
<400> 17
atgccttgca gatcaataac acagcagtag g 31

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer
<400> 18
caggaggacc gagagctcat 20

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 19
gcicgcttgg gcagaagata ga 22

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 20
cctcagcccg tcacagocca a 21

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 21
gccagagct cttoctaaaa ca 22

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 22
tgctggacc aaacaaaatg 20

<210> 23
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> probe
<400> 23
ttccagttt ttccatctgc aotgcca 27

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer

<400> 24
tgccatccaa ccactcagtc 20

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 25
ctcgcacgct gataacaatt ctg 23

<210> 26
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> probe

<400> 26
cggtagagcc caatgcaaac agaatt 26

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 27
gcaacatcat tccctctttg g 21

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 28
gcaggctctc gtcacgcttc t 21

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 29
gatgatccca atgagtcggc t 21

1. Method for identifying a subject at risk of hypertensive end organ damage, comprising:
 - (a) obtaining a biological sample of said subject;
 - (b) determining the level of at least one non-myocytical marker in said sample, wherein the non-myocytical marker is selected from the group consisting of galectin-3 and thrombospondin-2;
 - (c) comparing the level of said marker to a standard level; and
 - (d) determining whether the level of the marker is indicative of a risk for developing hypertensive end organ damage.
2. Method as claimed in claim 1, wherein the biological sample is a plasma sample derived from peripheral blood.
3. Method as claimed in claim 1 or 2, wherein the level of the marker is measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
4. Use of one or more non-myocytal markers for identifying a subject at risk of developing hypertensive end organ damage, wherein the non-myocytal marker is selected from the group consisting of galectin-3 and thrombospondin-2.
5. Use of galectin-3 for the manufacture of a medicament for the prevention and/or treatment of congestive heart failure and/or hypertensive end organ damage.
6. Use of thrombospondin-2 for the manufacture of a medicament for the prevention and/or treatment of congestive heart failure and/or hypertensive end organ damage.

(57) Abstract: The present invention relates to a method for identifying a subject at risk of developing hypertensive end organ damage, such as and in particular heart failure, comprising: a) obtaining a biological sample of said subject; b) determining the level of at least one non-myocytal marker in said sample; c) comparing the level of said marker to a standard level; and d) determining whether the level of the marker is indicative of a risk for developing hypertensive end organ damage. The non-myocytal marker preferably is galectin-3 or thrombospondin-2.

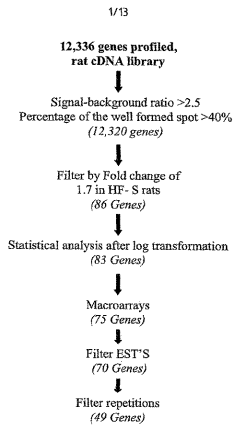


FIG. 1

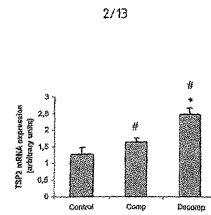


FIG. 2A

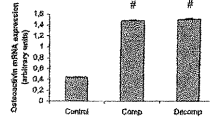


FIG. 2B

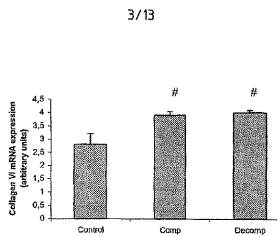


FIG. 2C

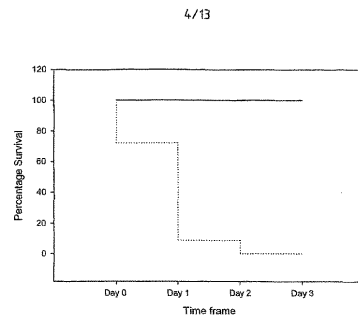


FIG. 3

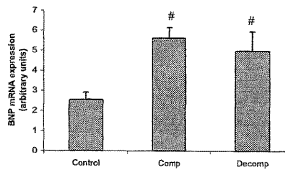


FIG. 2D

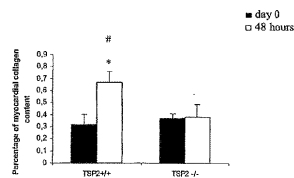


FIG. 4

5/13

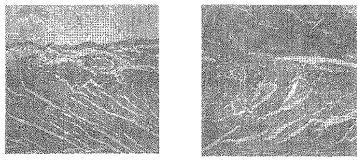


FIG. 5A

FIG. 5B

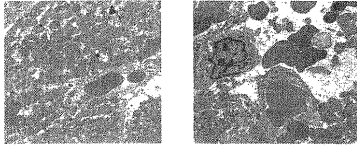


FIG. 5C

FIG. 5D

6/13

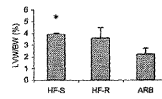


FIG. 6A

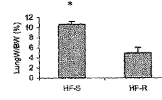


FIG. 6B

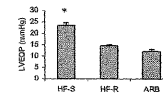


FIG. 6C

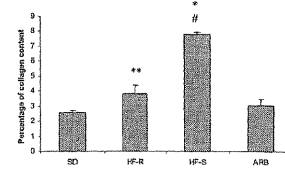


FIG. 7

7/13

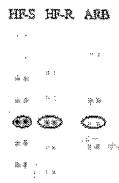


FIG. 8A

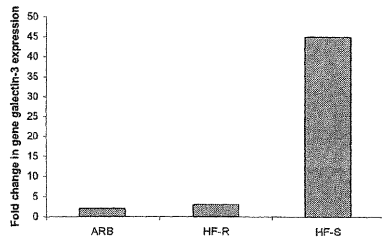


FIG. 8B

8/13



SD HF-R HF-S ARB

FIG. 9A1



SD HF-R HF-S ARB

FIG. 9B1

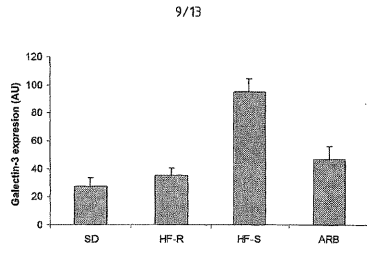


FIG. 9A2

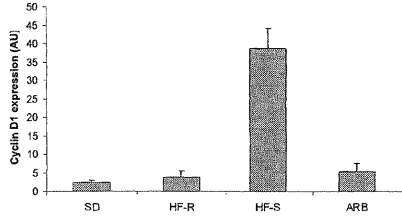


FIG. 9B2

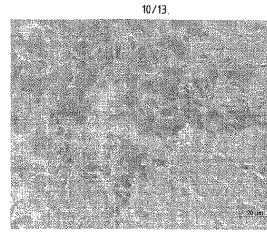


FIG. 10A

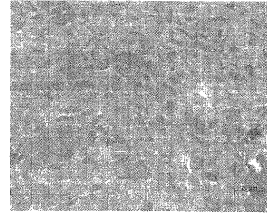


FIG. 10B

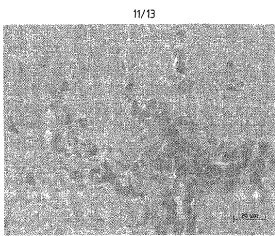


FIG. 10C



FIG. 10D

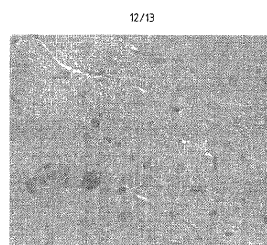


FIG. 10E

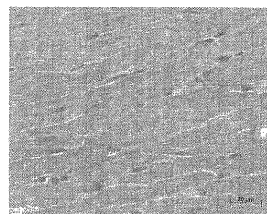


FIG. 10F

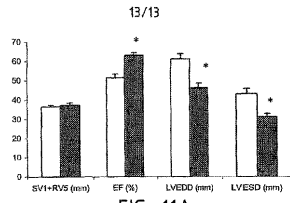


FIG. 11A

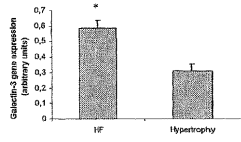


FIG. 11B

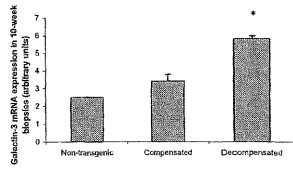


FIG. 12

专利名称(译)	通过量化半乳糖凝集素-3或血小板反应蛋白-2的水平鉴定具有发生心力衰竭风险的受试者的方法		
公开(公告)号	JP2010279378A	公开(公告)日	2010-12-16
申请号	JP2010167334	申请日	2010-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	马斯特里赫特大学		
申请(专利权)人(译)	UNI下迪迪泰特马斯特里赫特		
[标]发明人	イーガルエムピント		
发明人	イーガル・エム・ピント		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 A61K38/00 A61P9/04 A61P9/12 A61P9/00 G01N33/68 G01N33/94		
CPC分类号	A61P9/00 A61P9/04 A61P9/12 G01N33/6887 G01N33/9453 G01N2333/4724 G01N2333/4728 G01N2800/321 G01N2800/325 Y10S436/811 G01N33/6893 G01N2333/4704 G01N2800/50		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.D A61K37/02 A61P9/04 A61P9/12 A61P9/00 A61K38/00 C12N15/09.200 C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6851.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZA36 4C084/ZA362 4C084/ZA42 4C084/ZA422		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 佐藤 剛 矢野正树		
优先权	2003078161 2003-10-09 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于识别有发生高血压终末期器官损害（例如充血性心力衰竭）风险的受试者的方法。一种用于在有发生高血压终末期器官损害风险的患者外周血血浆样品的mRNA或蛋白质水平上测量非肌细胞标记物半乳糖凝集素3或血小板反应蛋白2的水平的方法。.. galectin-3或thrombospondin-2在制备用于预防/治疗疾病的药物中的用途。 [选择图]无

塩基ナノノプライム	配列 (5' → 3')	位置	種
シクロフィリン A (M19533)			
Fwd	GGGAGAAAGGATTGGCTATAAGG	167-190	ラット
プローブ	TGAAGTCACCACCTGGCAGATGAAT	219-244	
Rev	GCCACCAGTGCCATTATGG	249-267	
トロンボスポンジン 2 (XM_214778)			
Fwd	GAAATGGTCTACTTCTCAGACCTCAA	603-629	ラット
	G		
プローブ	CCCTGCTCTAGGCATCTCTGCACT	631-659	
	CAT		
Rev	GCACACTGCTGGAGCTGGA	791-809	
オステオアクチリン (NM_002510)			
Fwd	GGACTTCATTGTGACCTGCAAAA	1350-1371	ラット
プローブ	CCACTCCACGGAAGCCTGTACGAT	1376-1400	
Rev	ACCCTGTTCTGGGCGATCT	1421-1439	
コラーゲン VI (TC322135)			
Fwd	CCCTCCTTGACGGCAGAAC	816-834	ラット
プローブ	ATGCCCTGCAGATCAATAACACAGCA	845-875	
	GTAGG		
Rev	CAGGAGACCGAGAGCTCAT	897-916	
脳ナトリウム排泄性ペプチド (M25297)			
Fwd	GCTGCTTTGGGCAGAAGATAGA	350-371	ラット
プローブ	CCTCAGCCGTCACAGCCCAA	394-414	
Rev	GCCAGGAGTCTTCTAAAACA	416-437	