

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6078466号
(P6078466)

(45) 発行日 平成29年2月8日(2017.2.8)

(24) 登録日 平成29年1月20日(2017.1.20)

(51) Int.Cl. F 1
 GO 1 N 33/68 (2006.01) GO 1 N 33/68
 GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

請求項の数 4 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2013-524744 (P2013-524744)	(73) 特許権者	599002043
(86) (22) 出願日	平成24年7月19日 (2012.7.19)		学校法人 名城大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/068348		愛知県名古屋市天白区塩釜口1-501
(87) 国際公開番号	W02013/012038	(74) 代理人	110000497
(87) 国際公開日	平成25年1月24日 (2013.1.24)		特許業務法人グランダム特許事務所
審査請求日	平成27年7月13日 (2015.7.13)	(72) 発明者	鍋島 俊隆
(31) 優先権主張番号	特願2011-160052 (P2011-160052)		愛知県名古屋市天白区八事山150番地
(32) 優先日	平成23年7月21日 (2011.7.21)		学校法人名城大学八事キャンパス内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	毛利 彰宏
(31) 優先権主張番号	特願2011-228055 (P2011-228055)		愛知県名古屋市天白区八事山150番地
(32) 優先日	平成23年10月17日 (2011.10.17)		学校法人名城大学八事キャンパス内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	審査官	三木 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セロトニントランスポーター分析キット及び血中ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プロテアソーム阻害剤と、抗セロトニントランスポーター抗体を含み、採取した血液検体における未処理セロトニントランスポーター量及び阻害剤処理セロトニントランスポーター量の分析に使用することを特徴とするセロトニントランスポーター分析キット。

【請求項2】

うつ病の診断に用いることを特徴とする請求項1に記載のセロトニントランスポーター分析キット。

【請求項3】

ユビキチン化蛋白質回収材と、抗セロトニントランスポーター抗体を含み、採取した血液検体におけるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率の分析に使用することを特徴とする血中ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キット。

【請求項4】

うつ病の診断に用いることを特徴とする請求項3に記載の血中ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規マーカーを利用する方法、セロトニントランスポーター分析キット及びユビキチン化セロトニントランスポーター分析キットに関する。

【背景技術】

【0002】

うつ病とは、アメリカ精神医学会の精神障害の診断・統計マニュアル第4版(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-4)において、慢性的な抑うつ気分、興味・喜びの消失、著しい体重の変化、不眠もしくは過眠、気力の減退、精神運動性の焦燥もしくは静止、無価値感・罪悪感、思考力・集中力の減退、自殺念慮などの症状を示す病である。

【0003】

うつ病の病態においては、セロトニン、ノルアドレナリンおよび、ドーパミンの神経伝達の低下が関与するモノアミン仮説が提唱されている。セロトニンに関しては、健常人ではシナプス前神経終末からシナプス間隙に十分な量のセロトニンが放出され、シナプス後神経終末に存在するセロトニン受容体がセロトニンを受容することでシグナル伝達が行われ、セロトニントランスポーターがシナプス間隙の余剰のセロトニンを除去し、再度シナプス前神経終末からシナプス間隙にセロトニンが放出される。一方、うつ病の患者ではシナプス前神経終末からのセロトニン放出量が不十分であり、シナプス後神経終末は十分なセロトニンを受容できないと考えられる。即ち、うつ病の患者ではシナプス間隙のセロトニン量が不足していると考えられる。

【0004】

上記モノアミン仮説を前提として、セロトニンを指標としたうつ病の診断やセルトラリン(SSRI)等の選択的セロトニン再取り込み阻害物質を有効成分とする抗うつ薬がある。

【0005】

上記セロトニントランスポーターは中枢神経系での発現と血小板および白血球での発現に関連が報告されている。血小板およびリンパ球を含む白血球におけるセロトニントランスポーターが中枢セロトニン神経のセロトニントランスポーターと多くの点で共通した性質を持っていることから、末梢血から得られる血小板およびリンパ球を含む白血球をうつ病の生物学的マーカーとして応用するための研究がなされている。また、血小板でセロトニン吸収を行っているセロトニントランスポーターはセロトニン系神経細胞で表出しているものと遺伝子配列が同じであるとの報告もある。更に、セロトニントランスポーターの発現変化と、中枢神経系での機能および季節性情動障害などの精神症状との関連が報告されている。しかし、当該関連を裏付けるメカニズムは未だ明らかではない。

【0006】

また、セロトニンが関連するうつ病を治療する抗うつ薬を創製するために多くのうつ病モデル動物が提案されている。これらモデル動物はうつ病様の行動態様を示し、セロトニンの投与やシナプス間隙からのセロトニン再取り込みの阻害によりうつ病様の行動態様を示さなくなる。よって、抗うつ薬の候補物質のスクリーニングを行うためにうつ病モデル動物が利用される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Reiderer P. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. J Neurochem. 1993 Jun;60(6):2319-22. 上記非特許文献1には、脳と血小板のセロトニントランスポーターは遺伝的・構造的に同一であることの開示がある。

【0008】

【非特許文献2】Uebelhack R, Franke L, Herold N, Plotkin M, Amthauer H, Felix R. Brain and platelet serotonin transporter in humans-correlation between[123I]-ADAM SPECT and serotonergic measurements in platelets. Neurosci Lett.2006 Oct 9;406(3):153-8. 上記非特許文献2には、脳と血小板のセロトニン再取り込み活性の相関が女性において強く認められることの開示がある。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

【非特許文献3】Willeit M, Sitte HH, Thierry N, Michalek K, Praschak-Rieder N, Zillip, Winkler D, Brannath W, Fischer MB, Bondy B, Kasper S, Singer EA. Enhanced serotonin transporter function during depression in seasonal affective disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Jun;33(7):1503-13. 上記非特許文献3には、季節性情動障害の患者のうつ状態の発現時において、セロトニン再取り込み活性の増加が認められることの開示がある。

【 0 0 1 0 】

【非特許文献4】Iga J, Ueno S, Yamauchi K, Motoki I, Tayoshi S, Ohta K, Song H, Morita K, Rokutan K, Ohmori T. Serotonin transporter mRNA expression in peripheral leukocytes of patients with major depression before and after treatment with paroxetine. *Neurosci Lett*. 2005 Nov 25;389(1):12-6. 上記非特許文献4には、うつ病の患者の白血球において、セロトニントランスポーター遺伝子の転写量(mRNA)の増加が認められることの開示がある。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 1 】

うつ病は、患者の行動態様から診断することが可能である一方で特定のマーカーを利用して物理的・化学的・生物学的に診断することも可能である。

【 0 0 1 2 】

従前、上記モノアミン仮説に基づき血中のセロトニン量をマーカーとするうつ病の診断方法が開示されていたが、その精度が必ずしも満足できるものではなかった。即ち、体内のセロトニンの約90%は消化管に存在するため、血中のセロトニン量が脳内のその量をあまり反映しないためである。

20

【 0 0 1 3 】

また、脳におけるセロトニントランスポーターを可視化してうつ病を診断する方法も開示されているが、高価な装置が必要であり、また、人体への放射性トレーサーの投与が必須であるので、より簡便なうつ病の診断方法が望まれていた。

【 0 0 1 4 】

本願発明者はMAGE-D1遺伝子欠損マウスを用いて、その生理機能を検討した。その結果、MAGE-D1遺伝子欠損マウスが、うつ病様の行動態様を示すこと、及び、ヒトに対して効果がある選択的セロトニン再取り込み阻害薬を当該マウスに投与することでうつ病様の行動態様を示さなくなること等を見出した。即ち、セロトニンが関連するヒトのうつ病において、本マウスが非常に妥当性の高いうつ病モデルであることを発見した。さらに、培養細胞を用いた生化学的研究を実施した結果、MAGE-D1蛋白質とセロトニントランスポーターが結合するという興味深い事実を見出した。更に、MAGE-D1蛋白質の過剰発現によりセロトニントランスポーター量が減少するという興味深い事実を見出した。即ち、MAGE-D1蛋白質量とセロトニントランスポーター量との間に関連性が見出された。

30

【 0 0 1 5 】

見出した当該関連性に基づいてセロトニンが関与するうつ病のメカニズムを更に探索した結果、本願発明者は、MAGE-D1蛋白質の存在下でプロテアソーム阻害剤を使用すると高分子量化されたセロトニントランスポーター量が増大する、という興味深い事実を見出した。更に、セロトニントランスポーターがユビキチン化されることを同定した。MAGE-D1遺伝子欠損マウス及び培養細胞を用いた以上の結果から、セロトニントランスポーターはユビキチンが付加されることにより高分子量化しプロテアソームにより分解され、この流れはMAGE-D1蛋白質により促進される、と考えられた。MAGE-D1遺伝子欠損マウスは、ヒトうつ病様の行動態様を示しヒト抗うつ薬によりうつ病様の行動態様を示さなくなるので、ヒトと同様のうつ病メカニズムを有していると考えられる。よって、セロトニントランスポーターはユビキチンが付加されることにより高分子量化し

40

50

プロテアソームにより分解される、とヒトにおいても合理的に推測される。

【0016】

以上の知見に基づき、本願発明者は本発明を完成させた。うつ病決定方法を含む新規マーカーを利用する方法及びユビキチン化セロトニントランスポーター分析キットを提供することを本発明が解決すべき課題とする。

また、セロトニントランスポーター分析キットを提供することを本発明が解決すべき課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0017】

(第1発明)

上記課題を解決するための本願第1発明の構成は、
被験者から採取した血液検体におけるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を分析する工程を含むうつ病決定方法である。

10

【0018】

(第2発明)

上記課題を解決するための本願第2発明の構成は、
前記うつ病決定方法が、更に被験者から採取した血液検体から得たユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率と、少なくとも1人の健常者から得た対照たるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を比較する工程を含む第1発明に記載のうつ病決定方法である。

20

【0019】

(第3発明)

上記課題を解決するための本願第3発明の構成は、
前記比較の結果、被験者から採取した血液検体から得たユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率が対照より低レベルである場合に当該被験者がうつ病であると決定する第2発明に記載のうつ病決定方法である。

【0020】

(第4発明)

上記課題を解決するための本願第4発明の構成は、
ユビキチン化蛋白質回収材と、抗セロトニントランスポーター抗体を含み、採取した血液検体におけるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率の分析に使用する血中ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キットである。

30

【0021】

(第5発明)

上記課題を解決するための本願第5発明の構成は、
うつ病の診断に用いる第4発明に記載の血中ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キットである。

【0022】

(第6発明)

上記課題を解決するための本願第6発明の構成は、
被験者から採取した血液検体において、下記未処理セロトニントランスポーター量、及び、下記阻害剤処理セロトニントランスポーター量を分析する工程を含むうつ病決定方法である。

40

(1) 未処理セロトニントランスポーター量：血液検体におけるセロトニントランスポーター量。

(2) 阻害剤処理セロトニントランスポーター量：プロテアソーム阻害剤を作用させた血液検体におけるセロトニントランスポーター量。

【0023】

(第7発明)

上記課題を解決するための本願第7発明の構成は、

50

更に、少なくとも一人の健常者から採取した血液検体において、前記未処理セロトニントランスポーター量及び前記阻害剤処理セロトニントランスポーター量を分析する工程を含み、

更に、以下の(3)～(5)のいずれか1以上の比較工程を含む第6発明に記載のうつ病決定方法である。

(3) 前記被験者から採取した血液検体から得た未処理セロトニントランスポーター量と阻害剤処理セロトニントランスポーター量との量差(未処理・阻害剤処理量差)と、前記健常者から採取した血液検体から得た未処理・阻害剤処理量差とを比較する工程。

(4) 前記被験者から採取した血液検体から得た未処理セロトニントランスポーター量と、前記健常者から採取した血液検体から得た未処理セロトニントランスポーター量とを比較する工程。

(5) 前記被験者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量と、前記健常者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量とを比較する工程。

【0024】

(第8発明)

上記課題を解決するための本願第8発明の構成は、

以下の(6)～(8)のいずれか1以上に該当する場合に被験者がうつ病であると決定する第7発明に記載のうつ病決定方法である。

(6) 前記被験者から採取した血液検体から得た未処理・阻害剤処理量差が、前記健常者から採取した血液検体から得た未処理・阻害剤処理量差より小さい場合。

(7) 前記被験者から採取した血液検体から得た未処理セロトニントランスポーター量が、前記健常者から採取した血液検体から得た未処理セロトニントランスポーター量より多い場合。

(8) 前記被験者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量が、前記健常者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量より少ない場合。

【0025】

(第9発明)

上記課題を解決するための本願第9発明の構成は、

前記被験者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量が、未処理セロトニントランスポーター量の1.7倍以下となる場合に被験者がうつ病であると決定する第6発明に記載のうつ病決定方法である。

【0026】

(第10発明)

上記課題を解決するための本願第10発明の構成は、

プロテアソーム阻害剤と、抗セロトニントランスポーター抗体を含み、採取した血液検体における未処理セロトニントランスポーター量及び阻害剤処理セロトニントランスポーター量の分析に使用するセロトニントランスポーター分析キットである。

【0027】

(第11発明)

上記課題を解決するための本願第11発明の構成は、

うつ病の診断に用いる第10発明に記載のセロトニントランスポーター分析キットである。

【発明の効果】

【0028】

(第1発明～第3発明)

上述の通り、セロトニントランスポーターはユビキチンが付加されることにより高分子量化しプロテアソームにより分解される、とヒトにおいても合理的に推測される。

【0029】

10

20

30

40

50

上記第1発明～第3発明により、第1に新規マーカーであるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を利用するうつ病決定方法が提供される。本願発明者の発見事実に基づけば、セロトニントランスポーターがユビキチン化されないと、体内に過剰のセロトニントランスポーターが存在しシナプス間隙におけるセロトニン量が不十分になり、うつ病が引き起こされると考えられる。また、上述の通り、セロトニントランスポーターは中枢神経系での発現と血小板およびリンパ球を含む白血球での発現に関連が報告されている。

【0030】

本方法の発明はユビキチン化されたセロトニントランスポーターの絶対量ではなく同一検体におけるその比率を利用するので、血液検体の採取状況（体調の変化、採取量の相違、採取時期の相違など）や個人差による影響を少なくでき、高い精度の結果が得られると考えられる。

10

【0031】

セロトニントランスポーターはユビキチン化を受けた後にプロテアソームにより分解されると考えられるので、血液検体の分析から得たユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率は血液検体を取得した段階のみならず時間的な幅を持つセロトニン量変化の測定結果に相当する情報を含んでいると考えられる。

【0032】

従前は、セロトニントランスポーターのユビキチン化を経る分解経路が明らかでなかったため血中のセロトニン量の変化であっても予測が困難であり、また、被験者の連続的な採血は人体への負担が大きいため、血液検体を取得した段階のみの血中セロトニン量という限られた情報に基づいてうつ病の診断がなされていた。更に、上述の通り、体内のセロトニンの約90%は消化管に存在するため、血中のセロトニン量は脳内のその量をあまり反映しないと考えられる。

20

【0033】

一方、セロトニンではなくセロトニントランスポーターに着目すると、血小板およびリンパ球を含む白血球におけるセロトニントランスポーターが中枢セロトニン神経のセロトニントランスポーターと多くの点で共通した性質を持っている。本方法の発明は血液検体取得時の血中セロトニン量をマーカーとするうつ病の診断方法と比べて、より多く、より質の高い情報を加味した方法であるので精度が高いと考えられる。

30

【0034】

また、脳におけるセロトニントランスポーターを可視化してうつ病を診断する方法と比べると、本発明は高価な可視化装置が不要であること、人体への放射性トレーサーの投与が不要であることから、簡便で人体への負担が少ない診断方法である。

【0035】

被験者の血液検体から得たユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率と健常者から得た対照たるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率とを比較することでより有効なうつ病決定方法となる。

【0036】

そして、被験者の血液検体から得たユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率が対照より低レベルである場合にうつ病と決定すると、更に有効なうつ病決定方法となる。

40

【0037】

（第4発明及び第5発明）

上記第4発明及び第5発明により、血中ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キットが提供される。当該キットの構成は「セロトニントランスポーターはユビキチンが付加されることにより高分子量化しプロテアソームにより分解される」という本願発明者の知見に基づくものである。特に、うつ病の診断に用いることで有利な効果を奏する。また、上記第1発明～第3発明の実施に使用することも有用である。

【0038】

50

(第6発明～第9発明)

本願発明者の発見事実に基づけば、セロトントランスポーター量の組合せをマーカーとして有用なうつ病決定方法とすることも可能である。本方法は、セロトントランスポーターはユビキチンが付加されることにより高分子量化しプロテアソームにより分解されるという発見事実を踏まえつつ、セロトントランスポーター量の挙動に着目する。よって、比率を利用する利点を除いて上述の効果を得つつ、ユビキチン化されたセロトントランスポーターの検出、測定を不要とし、簡便に実行できる。

【0039】

後述する実施例では、健常者におけるセロトントランスポーターの発現はプロテアソーム阻害剤の添加により増加した。一方、抗うつ薬に応答性ならびに非応答性のうつ病患者におけるセロトントランスポーターの発現の増加幅は健常者と比較して少なかった。

【0040】

よって、血液検体にプロテアソーム阻害剤を作用させた場合、及び、作用させない場合におけるセロトントランスポーター量に着目した有用なうつ病決定方法となる。

【0041】

更に、上記(3)～(5)に記載したいずれか1以上の比較工程を行うことで、より有効なうつ病決定方法となる。

【0042】

更に、上記(6)～(8)に記載したいずれか1以上に該当する場合にうつ病と決定すると、より有効なうつ病決定方法となる。

【0043】

セロトントランスポーターがユビキチン化されないと、体内に過剰のセロトントランスポーターが存在しシナプス間隙におけるセロトニン量が不十分になり、うつ病が引き起こされると考えられる。

【0044】

よって、プロテアソーム阻害剤の作用によるセロトントランスポーター量の増加が認められなくなるほど、体内に過剰のセロトントランスポーターが存在すると考えられ、うつ病を患っている可能性が高くなると考えられる。上記未処理・阻害剤処理量差に着目することは有効であると考えられる。

【0045】

また、健常者とうつ病患者を対比すると、うつ病患者の血液検体ではその後の分解に供されるユビキチン化されたセロトントランスポーター量が少ないと考えられる。即ち、うつ病患者ではセロトントランスポーター量が多いと考えられる。よって、上記未処理セロトントランスポーター量に着目することも有効である。

【0046】

逆に、プロテアソーム阻害剤を作用させると、ユビキチン化されたセロトントランスポーターの分解が進行しなくなると考えられる。即ち、健常者ではセロトントランスポーター量が増加するが、うつ病患者では健常者のような増加は見られない。よって、上記阻害剤処理セロトントランスポーター量に着目することも有効である。

【0047】

その他、被験者から得た阻害剤処理セロトントランスポーター量と未処理セロトントランスポーター量とを対比するうつ病決定方法も有効である。この場合、健常者のデータを不要とし、簡便に実行できる。

【0048】

(第10発明及び第11発明)

上記第10発明及び第11発明により、セロトントランスポーター分析キットが提供される。当該キットの構成は、「健常者におけるセロトントランスポーターの発現はプロテアソーム阻害剤の添加により増加した。一方、抗うつ薬に応答性ならびに非応答性のうつ病患者におけるセロトントランスポーターの発現の増加幅は健常者と比較して少なかった。」という本願発明者の知見に基づくものである。特に、うつ病の診断に用いるこ

10

20

30

40

50

とで有利な効果を奏する。また、上記第6発明～第9発明の実施に使用することも有用である。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】モデルマウスにおけるうつ様の行動が、ヒト抗うつ薬により、用量依存的に緩解されることを示す。

【図2】高カリウム刺激による細胞外セロトニン遊離量の増加が、モデルマウスにおいて有意に低下することを示す。

【図3】MAGE-D1遺伝子過剰発現系が、MAGE-D1遺伝子過剰発現の影響を検討するのに十分な系であることを示す。

【図4】(a)モデルマウスの前頭皮質ではセロトニントランスポーター蛋白質量が増加していることを示す。(b)このようなモデルマウスと対照マウスで、セロトニントランスポーターmRNA量に有意な差がないことを示す。(c)モデルマウスにおいてユビキチン化セロトニントランスポーター蛋白質量が有意に低下することを示す。

【図5】セロトニントランスポーター蛋白質とMAGE-D1蛋白質が結合することを示唆するデータを示す。

【図6】(a)、(b)ともにセロトニントランスポーター蛋白質とMAGE-D1蛋白質が結合することを示唆するデータを示す。

【図7】(a)MAGE-D1遺伝子の概念図、及び実施例にて使用した各MAGE-D1部分コンストラクト遺伝子の概念図を示す。(b)MAGE-D1蛋白質がNHドメインを介してセロトニントランスポーター蛋白質に結合することを示唆するデータを示す。

【図8】(a)MAGE-D1蛋白質の強制発現によりセロトニントランスポーター蛋白質の発現が減少したことを示す。(b)MAGE-D1蛋白質の強制発現によりセロトニン再取り込み活性が減少したことを示す。

【図9】セロトニントランスポーター蛋白質はユビキチン化により高分子量化されること、及びMAGE-D1遺伝子の強制発現によりユビキチン化セロトニントランスポーター蛋白質量が増加することを示す。

【図10】健常者及びうつ病患者由来の株化リンパ球における、セロトニントランスポーター発現量とユビキチン化セロトニントランスポーター蛋白質量の測定結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

以下に、本発明を実施するための形態を、最良の形態を含めて説明する。

【0051】

本発明においてユビキチンは、ユビキチン依存性プロテアソーム系による蛋白質分解に利用されるものである限り特に限定されない。

【0052】

本発明においてセロトニントランスポーターは、セロトニンの取り込みに関与するものである限り特に限定されない。好ましくは、シナプス間隙を形成する神経細胞に表出するセロトニントランスポーター、血小板に存在するセロトニントランスポーター、リンパ球を含む白血球に存在するセロトニントランスポーター、消化管粘膜に存在するセロトニントランスポーター、平滑筋に存在するセロトニントランスポーター、肺に存在するセロトニントランスポーターである。より好ましくはシナプス間隙を形成する神経細胞に表出するセロトニントランスポーター、血小板に存在するセロトニントランスポーター、リンパ球を含む白血球に存在するセロトニントランスポーターであり、更に好ましくは血小板に存在するセロトニントランスポーター、リンパ球に存在するセロトニントランスポーターである。

【0053】

セロトニントランスポーターはS型とL型の遺伝子多型があり、種々の分子量のセロトニントランスポーターが血小板、リンパ球を含む白血球等から調製したサンプルのウエス

10

20

30

40

50

タンブロットティングにおいても検出され得る。本発明におけるセロトニントランスポーターの種類は特に限定されない。

【0054】

本発明においてユビキチン化されたセロトニントランスポーターとは、1以上のユビキチンが結合したセロトニントランスポーターである。ユビキチンは分子量約8.6kDの低分子量タンパクであり、ユビキチン化されたセロトニントランスポーターは泳動等において本来の分子量(約70kD)からスメア状に高分子量のシグナルが認められ、好ましくは100kD以上のユビキチン化されたセロトニントランスポーターである。

【0055】

セロトニントランスポーターはユビキチンが付加されることにより高分子量化しプロテアソームにより分解される、とヒトにおいても合理的に推測される。更に、セロトニントランスポーターがユビキチン化されないと、体内に過剰のセロトニントランスポーターが存在しシナプス間隙におけるセロトニン量が不十分になり、うつ病が引き起こされると考えられる。よって、ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの割合が低くなるほどうつ病を患っている可能性が高くなると考えられる。

【0056】

本発明においてユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率は検体におけるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの割合を示す。当該比率の計算式は適宜選択可能であるが、例えば、(イ)セロトニントランスポーター全量に対するユビキチン化されたセロトニントランスポーター量、(イ')ユビキチン化されたセロトニントランスポーター量に対するセロトニントランスポーター全量、(ロ)ユビキチンが結合していないセロトニントランスポーター量に対するユビキチン化されたセロトニントランスポーター量、(ロ')ユビキチン化されたセロトニントランスポーター量に対するユビキチンが結合していないセロトニントランスポーター量、(ハ)セロトニントランスポーター全量に対する高分子量セロトニントランスポーター量、(ハ')高分子量セロトニントランスポーター量に対するセロトニントランスポーター全量、(ニ)ユビキチンが結合していないセロトニントランスポーター量に対する高分子量セロトニントランスポーター量、(ニ')高分子量セロトニントランスポーター量に対する)ユビキチンが結合していないセロトニントランスポーター量等を例示することができる。計算式の種類によっては比率の値が大きくなるほど、ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの割合が低くなることを示す場合がある。被験者の当該比率を健常者から得た対照と比較する場合、被験者の当該比率の算出方法と対照の算出方法を統一することが好ましい。

【0057】

また、プロテアソーム阻害剤によりユビキチン化されたセロトニントランスポーターのプロテアソームでの分解を抑制した検体において、より顕著にユビキチン化されたセロトニントランスポーターの割合の変化について検討することも本発明の実施形態に含む。

【0058】

上記比率を算出する際に使用する単位は特に限定されず、検体を分析する方法にあわせて適宜選択可能である。例えば、質量を用いても良いし、分子数を用いても良いし、ウエスタンブロットティング法を含む泳動法によるシグナル強度を用いても良い。好ましくは、ウエスタンブロットティング法によるシグナル強度を用いる。より好ましくは、ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)、EIA(Enzyme immunoassay)及びRIA(Radio-Immuno Assay)による質量もしくは分子数を用いる。質量などユビキチン化の度合いで値が変化する単位を用いる場合は、ユビキチン化されたセロトニントランスポーター量としてユビキチン量を除いた換算値を用いることが好ましい。被験者と健常者の上記比率を比較する場合、単位は統一することが好ましい。

【0059】

〔新規マーカーを利用する方法〕

本発明の発明は新規マーカーとしてユビキチン化されたセロトニントランスポーターの

10

20

30

40

50

比率を用いる。

【0060】

本方法の発明は被験者から採取した血液検体におけるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を分析する工程を含む。好ましくは、上記工程を含むうつ病の診断方法、又はうつ病の決定方法である。うつ病の決定方法は医師による医療行為を含まない。

【0061】

本方法の発明においては、血液検体を提供する本方法の発明の実施対象者を被験者と称する。必ずしも医師によってうつ病を患っていると診断された者に限定されない。一方、対照たるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率は健常者から求めるので当該健常者は被験者ではない。

10

【0062】

血液検体はユビキチン化されたセロトニントランスポーターを含む限り特に限定されない。上述の通り、セロトニントランスポーターは中枢神経系での発現と血小板、リンパ球を含む白血球での発現に関連が報告されており、血小板やリンパ球を含む白血球におけるセロトニントランスポーターの変化と、中枢神経系での機能および季節性情動障害などの精神症状との関連が報告されている。よって、被験者の血液は好適な検体である。当該血液検体は動脈血や静脈血の別も限定されず、当該血液検体を採取する部位も限定されない。好ましい血液検体は、抹消血、脊髄液を例示でき、より好ましくは抹消血を例示することができる。血液検体は公知である常法に従って被験者から採取可能である。また、血液検体は公知である常法に従って保存可能である。

20

【0063】

セロトニントランスポーター蛋白質のユビキチン化は抗うつ薬をはじめとする治療薬やストレスなどの身体の影響を受ける可能性がある。これらの影響を除外してうつ病の決定や診断を行う場合でも、血液の採取はいつであってもよい。例えば、株化によるリンパ球を含む白血球のメディウム中での培養により血液内の抗うつ薬や身体の影響を解消できることが知られている。そのため、ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を利用するうつ病の診断や決定は、抗うつ薬の投薬の有無等に関わらず有効であると考えられる。一方、被験者の抗うつ薬の治療効果やストレスなどを加味して検討する場合は株化せずに血液中の血小板やリンパ球を含む白血球におけるセロトニントランスポーター蛋白質のユビキチン化を検討してもよい。

30

【0064】

血液検体は更に分画することも可能である。即ち、血液検体から分画した検体におけるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を分析してもよい。本方法の発明においては血小板画分、リンパ球を含む白血球画分を例示することができ、血小板画分、リンパ球画分を好ましく例示できる。

【0065】

上述した血液検体等の検体は、当該検体を含む組成としても良い。以下に例示する分析の手法に合わせて適宜選択可能である。

【0066】

本方法の発明に使用する検体の量はユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を求めることができる限り特に限定されない。ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を求める作業工程数や使用する試薬・機器の性能等にあわせて適宜決定すればよい。

40

【0067】

セロトニントランスポーター及びユビキチン化されたセロトニントランスポーターをユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を求めるために検体から精製する場合、当該精製方法は特に限定されない。血液検体におけるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率が維持される精製方法が好ましい。例えば、クロマトグラフィーや電気泳動を含む分子量や電荷等を利用した分画、沈殿、遠心分離、塩析、免疫沈降法、

50

ユビキチン又はセロトニントランスポーター特異的結合材を利用する方法等公知の方法を適宜利用することができる。

【0068】

ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を求めるための、セロトニントランスポーター及びユビキチン化されたセロトニントランスポーターの定量方法は特に限定されない。例えば、ウェスタンブロッティング法、フローサイトメトリー法、ELISA法、EIA法、RIA法、FIA法、化学発光イムノアッセイ、ECLIA法などの免疫学的方法を例示することができる。その他、電気泳動を利用する方法、吸光度を利用する方法等公知の方法を適宜利用することができる。定量手法によっては、血液検体をそのまま用いることができるし、また、血液検体からセロトニントランスポーター及びユビキチン化されたセロトニントランスポーターを簡便に分画するだけでよい場合もある。

10

【0069】

本方法の発明において「健常者」にはうつ病を患っていない者を限定なく含むが、好ましくは医師によってうつ病でないと診断された者であり、より好ましくは、心理的ストレスに暴露されていない者、他の神経・精神疾患に罹患していない者である。

【0070】

対照たるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率とは、健常者から得たユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率である。当該ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率の算出方法は被験者と健常者で統一することが好ましい。

20

【0071】

健常者から得る、対照たるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を算出するための検体は血液が好ましい。よって、健常者の血液検体から当該比率を求めることが好ましい。健常者の血液検体は被験者の血液検体と同様の処理が可能である。

【0072】

健常者から得た上記比率は対照として使用する。少なくとも1人の健常者から上記比率を得ることで十分であるが、複数人の健常者から得た上記比率の平均を利用すると本方法の発明の精度の向上が期待できる。

【0073】

本方法の発明においては、被験者の血液検体から得たユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率が対照より低レベルである場合に当該被験者がうつ病であると診断又は決定することが好ましい。ここで低レベルとは少なくとも被験者の血液検体から得たユビキチン化されたセロトニントランスポーターの割合が対照のユビキチン化されたセロトニントランスポーターの割合未満であることを含む概念である。好ましくは対照より有意差をもって低い場合である。上述の計算式等の選択によっては、被験者の血液検体から得たユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率の値が対照の値より大きくても「低レベル」と判断する場合があります。

30

【0074】

前記低レベルを判断するにおいて、被験者の血液検体から得たユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率が対照に対して70%以下であることがより好ましく、50%以下であることがより好ましく、40%以下であることが更に好ましい。上述の計算式等の選択によっては、当該「以下」を「以上」とすることが適切な場合がある。

40

【0075】

本方法の発明は、更に上記した様に検体にプロテアソーム阻害剤を加えることでユビキチン化セロトニントランスポーターを感度良く検出する方法とすることが好ましい。

プロテアソーム阻害剤による処理時間は特に限定されないが、30分～48時間であることが好ましい。より好ましくは2～12時間である。更に好ましくは4時間である。

プロテアソーム阻害剤による処理温度は特に限定されない。例えば、36～38が好ましい。37がより好ましい。

プロテアソーム阻害剤の濃度は、検体の形態に合わせて適宜決定すればよい。例示とし

50

て、1 ~ 200 μ Mが好ましい。より好ましくは10 ~ 100 μ Mである。更に好ましくは20 μ Mである。

本願発明者の発見事実に基づけば、ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの分解はうつ病と密接な関連があると考えられる。よって、プロテアソーム阻害剤は、うつ病検査薬として使用できる。

【0076】

本方法の発明の別の実施態様では、血液検体の他、被験者及び健常者の健康を維持できる範囲で取得可能な他の検体を利用することができる。例えば、脳脊髄液、リンパ液、再生医療技術を応用して任意の細胞や組織から誘導・分化させた神経細胞や組織、リンパ球などを株化させた細胞等を例示することができる。また、可視化技術を応用しても良い。

10

【0077】

〔ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キット〕

本発明のユビキチン化セロトニントランスポーター分析キットは、少なくともユビキチン化蛋白質の回収材及び抗セロトニントランスポーター抗体を含む。これらの使用順序は限定されず、これらを用いてセロトニントランスポーターとユビキチン化されたセロトニントランスポーターの判別を行うことができる。また、他の物と組み合わせてこれらを使用しても良い。本発明のユビキチン化セロトニントランスポーター分析キットは、更に、プロテアソーム阻害剤を含むことが好ましい。

【0078】

ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キットは検体に含まれるユビキチン化されたセロトニントランスポーター量を分析するのに適している。当該量の分析は検体中の絶対量の測定、相対量の測定を限定なく含み、特定の1又は2以上の他の成分との比較も含む概念である。好ましくは、検体における、上述したユビキチン化されたセロトニントランスポーターの比率を分析するのに適している。

20

【0079】

本発明のキットにおける上記検体はユビキチン化されたセロトニントランスポーターを含む限り特に限定されない。動物、植物、微生物、再生医療技術の応用により取得した物等を限定なく含む。また、細胞、組織、器官、個体の別も限定されず、適宜選択可能である。動物から得られる検体が好ましく、動物の体液及び動物の組織若しくは器官のホモジネートがより好ましく、血液が更に好ましく、血液から分画した血小板画分、リンパ球を含む白血球画分が更に好ましく、血小板画分、リンパ球画分が特に好ましい。検体は公知の常法により適宜取得可能である。

30

【0080】

本発明のキットは、うつ病の診断、うつ病の決定に用いられることが好ましい。また、上述の新規マーカーを利用する方法の実施に用いられることも好ましい。その他、自閉症・アスペルガー症候群などの他の精神疾患の診断の用途に用いることも好ましい。

【0081】

ユビキチン化蛋白質の回収材は、ユビキチンを識別可能であり、当該識別された蛋白質が回収される限り特に限定されない。例えば、抗体、ユビキチン結合蛋白質回収ビーズ等を例示することができる。ユビキチン化蛋白質の回収材は1又は2以上の部材の組み合わせでよく、適宜選択できる。適宜市販品を用いても良い。

40

【0082】

抗セロトニントランスポーター抗体は特に限定されない。モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体いずれも使用可能である。人工的に創製した抗体フラグメント等も使用できる。抗セロトニントランスポーター抗体は適宜市販品を用いても良い。

【0083】

プロテアソーム阻害剤も特に限定されないが、MG-132、ラクタシスチンが好ましい。

その他、オートファジー阻害剤として3-メチルアデニン、プロテアーゼ阻害剤としてE-64d等を例示できる。

50

【0084】

本発明のキットは、ユビキチン化セロトニントランスポーターの分析手法に合わせて、当該分析手法に適した物品を更に含んでも良い。分析手法としては、上述の定量方法を好ましく例示できる。例えば、各種の抗体、酵素、緩衝液、塩、培地、培養シート等の培養材料、安定化剤、防腐剤、形質転換細胞、形質転換用ベクター、プライマー、プローブ、遺伝子断片、*siRNA*、*shRNA*等の核酸、マーカー等を含んでも良いし、放射性物質、蛍光物質、色素等の適当な標識物質を含んでも良いし、反応プレート等の容器を含んでも良い。

【0085】

〔新規マーカーを利用する方法2〕

新規マーカーを利用する第二の方法の発明は、セロトニントランスポーター量の組合せをマーカーとして用いる。よって、ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの検出、測定は必須ではない。上述した用語については、以下の説明においても基本的に同様の意義で用いる。但し、技術的観点から本方法の発明において適した意義で理解され、更に用語の説明が必要な場合は、適宜説明を加える。

【0086】

本方法の発明は被験者から採取した血液検体において、未処理セロトニントランスポーター量、及び、阻害剤処理セロトニントランスポーター量を分析する工程を含む。好ましくは、上記工程を含むうつ病の診断方法、又はうつ病の決定方法である。

【0087】

本方法の発明は、ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの検出、測定は必須ではない。しかし、血液検体はユビキチン化されたセロトニントランスポーターを含んでよい。本方法における「セロトニントランスポーター量」は、好ましくは、ユビキチン化されたセロトニントランスポーター量を含む。即ち、「セロトニントランスポーター量」として血液検体に含まれるセロトニントランスポーター全量を用いることが好ましい。

【0088】

未処理セロトニントランスポーター量、及び、阻害剤処理セロトニントランスポーター量を分析するために、血液検体は少なくとも2連用意する必要がある。本方法の発明は比率ではなく「量」を利用するので、実質的に同量かつ同質であれば対比試験に好ましく適用できる。これらの観点をふまえて、被験者や健常者から血液検体を得る手段は限定されない。好ましくは、まず、一時に血液検体を用意し、その後、2連以上に分割して使用する。被験者における量と健常者における量を比較する場合は、被験者及び健常者で血液検体量を揃えることが好ましい。

【0089】

測定に供される検体の量を揃えることを前提に、血液検体は、濃縮や希釈等されても良い。また、血液検体の採取、取り扱いや分画、セロトニントランスポーターの精製や定量については、上述の記載を参照できる。

【0090】

未処理セロトニントランスポーター量は、未処理の血液検体におけるセロトニントランスポーター量を意味する。

【0091】

阻害剤処理セロトニントランスポーター量は、プロテアソーム阻害剤を作用させた血液検体におけるセロトニントランスポーター量を意味する。プロテアソーム阻害剤については上述の記載を参照できる。以下の説明において、血液検体にプロテアソーム阻害剤を作用させることを阻害剤処理と称することがある。

【0092】

以上の通り、上記「未処理」と、「阻害剤処理」との差は、プロテアソーム阻害剤の作用の有無である。上記「未処理」と「阻害剤処理」との具体的な処理の相違は、セロトニントランスポーター量の測定に合わせて適宜決定される。例えば、「阻害剤処理」はプロテアソーム阻害剤の添加を意味し、「未処理」は何ら添加しない場合もある。その他、

10

20

30

40

50

ロテアソーム阻害剤の処理量や濃度、処理時間、処理温度等が分画、精製、測定等との関係で適宜調整されうる。本方法の発明はセロトニントランスポーターの量を利用するので、「未処理」と「阻害剤処理」以外の分析条件は血液検体間で揃えることが好ましい。

【0093】

〔健常者との対比を行う方法〕

以下、上述の新規マーカーを利用する第二の方法において、健常者との対比を行う方法について述べる。上記した第7発明及び第8発明は健常者との対比を行う方法に該当する。

【0094】

本方法の発明は健常者から採取した血液検体において、前記未処理セロトニントランスポーター量及び前記阻害剤処理セロトニントランスポーター量を分析する工程を更に含む。健常者については上述の記載を参照できる。本方法の発明は少なくとも一人の健常者から採取した血液検体があれば実施可能である。一方、より多くの健常者から採取した血液検体を用意し、それぞれから未処理セロトニントランスポーター量及び阻害剤処理セロトニントランスポーター量を分析し、各量の平均値を本方法の発明に用いることも好ましい。

10

【0095】

更に、本方法の発明は、以下の(3)～(5)のいずれか1以上の比較工程を含む。好ましくは、以下の(3)～(5)のいずれか2つの比較工程を含み、より好ましくは以下の(3)～(5)の全ての比較工程を含む。以下の(3)～(5)のいずれか2つの比較工程を含む場合、(3)の比較工程を含むことが好ましい。

20

【0096】

(3)前記被験者から採取した血液検体から得た未処理セロトニントランスポーター量と阻害剤処理セロトニントランスポーター量との量差(以下、未処理・阻害剤処理量差とも称する。)と、前記健常者から採取した血液検体から得た未処理・阻害剤処理量差とを比較する工程。

【0097】

当該未処理・阻害剤処理量差は、未処理及び阻害剤処理の各血液検体に含まれるセロトニントランスポーターの存在量の差に着目する。重要なのは未処理の場合におけるセロトニントランスポーター量と、阻害剤処理の場合におけるセロトニントランスポーター量との差を把握することであり、演算上の符号の別等は適宜選択可能である。

30

【0098】

(4)前記被験者から採取した血液検体から得た未処理セロトニントランスポーター量と、前記健常者から採取した血液検体から得た未処理セロトニントランスポーター量とを比較する工程。

【0099】

健常者とうつ病患者を対比すると、うつ病患者の血液検体ではその後の分解に供されるユビキチン化されたセロトニントランスポーター量が少ないと考えられる。即ち、うつ病患者ではセロトニントランスポーター量が多いと考えられる。よって、上記未処理セロトニントランスポーター量に着目することも有効である。

40

【0100】

(5)前記被験者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量と、前記健常者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量とを比較する工程。

【0101】

プロテアソーム阻害剤を作用させると、ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの分解が進行しなくなると考えられる。即ち、健常者ではセロトニントランスポーター量が増加するが、うつ病患者では健常者のような増加は見られない。よって、上記阻害剤処理セロトニントランスポーター量に着目することも有効である。

【0102】

50

更に、本発明の方法は、以下の(6)~(8)のいずれか1以上に該当する場合に被験者がうつ病であると決定することが好ましい。より好ましくは、以下の(6)~(8)のいずれか2つに該当する場合に被験者がうつ病であると決定し、更に好ましくは以下の(6)~(8)の全てに該当する場合に被験者がうつ病であると決定する。以下の(6)~(8)への該当が増えるほど、うつ病の決定の精度が高まると考えられる。以下の(6)~(8)のいずれか2つに該当する場合は、好ましくは以下の(6)を含む。

【0103】

(6)前記被験者から採取した血液検体から得た未処理・阻害剤処理量差が、前記健常者から採取した血液検体から得た未処理・阻害剤処理量差より小さい場合。

【0104】

健常者とうつ病患者を対比すると、うつ病患者の血液検体ではその後の分解に供されるユビキチン化されたセロトニントランスポーター量が少ないと考えられる。プロテアソーム阻害剤の作用によるセロトニントランスポーター量の増加が認められなくなるほど、体内に過剰のセロトニントランスポーターが存在すると考えられ、うつ病を患っている可能性が高くなると考えられる。よって、未処理と阻害剤処理とでセロトニントランスポーターの量差が小さいほど、うつ病を患っている可能性が高いと考えられる。

【0105】

当該「量差が小さい」は、未処理及び阻害剤処理した血液検体間のセロトニントランスポーターの存在量の差が小さいことを意味する結果が得られれば良い。よって、演算手法によっては、結果の値が大きくても当該「量差が小さい」と判断することが適切な場合がある。

【0106】

例えば、当該量差を対照たる未処理セロトニントランスポーター量に対する阻害剤処理セロトニントランスポーター量の割合(%)で演算するならば、被験者の割合値が健常者の割合値を下回る場合に当該「量差が小さい」と判断することが好ましい。被験者の割合値が健常者の割合値より10%小さい場合に当該「量差が小さい」と判断することがより好ましい。被験者の割合値が健常者の割合値より15%小さい場合に当該「量差が小さい」と判断することが更に好ましい。被験者の割合値が健常者の割合値より20%小さい場合に当該「量差が小さい」と判断することが特に好ましい。

【0107】

(7)前記被験者から採取した血液検体から得た未処理セロトニントランスポーター量が、前記健常者から採取した血液検体から得た未処理セロトニントランスポーター量より多い場合。

【0108】

健常者とうつ病患者を対比すると、うつ病患者の血液検体ではその後の分解に供されるユビキチン化されたセロトニントランスポーター量が少ないと考えられる。即ち、未処理の状態ではうつ病患者の方が健常者より血液検体中のセロトニントランスポーター量が多いと考えられる。

【0109】

当該「多い」は、被験者と健常者の未処理の血液検体に含まれるセロトニントランスポーターの存在量を比較して、被験者の血液検体の方が健常者の血液検体よりセロトニントランスポーターの存在量が多いことを意味する結果が得られれば良い。よって、演算手法によっては、結果の値が小さくても当該「多い」と判断することが適切な場合がある。

【0110】

例えば、被験者から得た未処理セロトニントランスポーター量を対照たる健常者から得た未処理セロトニントランスポーター量に対する割合で演算するならば、被験者から得た未処理セロトニントランスポーター量が対照(100%とする。)を超える場合に当該「多い」と判断することが好ましい。被験者から得た未処理セロトニントランスポーター量が110%以上の場合に当該「多い」と判断することがより好ましい。被験者から得た未処理セロトニントランスポーター量が135%以上の場合に当該「多い」と判断すること

10

20

30

40

50

が更に好ましい。被験者から得た未処理セロトニントランスポーター量が150%以上の場合に当該「多い」と判断することが特に好ましい。

【0111】

(8) 前記被験者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量が、前記健常者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量より少ない場合。

【0112】

プロテアソーム阻害剤を作用させると、ユビキチン化されたセロトニントランスポーターの分解が進行しなくなると考えられる。即ち、健常者ではセロトニントランスポーター量が増加するが、うつ病患者では健常者のような増加は見られない。後述する実施例では、阻害剤処理により健常者の血液検体から得られるセロトニントランスポーター全量はい

10

うつ病患者の当該量を上回った。

【0113】

上記「少ない」は被験者と健常者の阻害剤処理した血液検体に含まれるセロトニントランスポーターの存在量を比較して、被験者の血液検体の方が健常者の血液検体よりセロトニントランスポーターの存在量が少ないことを意味する結果が得られれば良い。よって、演算手法によっては、結果の値が大きくても当該「少ない」と判断することが適切な場合がある。

【0114】

例えば、被験者から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量を対照たる健常者から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量に対する割合で演算するならば、被験者から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量が対照(100%とする。)未満の場合に当該「少ない」と判断することが好ましい。被験者から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量が90%以下の場合に当該「少ない」と判断することがより好ましい。被験者から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量が85%以下の場合に当該「少ない」と判断することが更に好ましい。被験者から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量が80%以下の場合に当該「少ない」と判断することが特に好ましい。

20

【0115】

〔被験者の血液検体のみを利用する方法〕

以下、上述の新規マーカーを利用する第二の方法において、被験者の血液検体のみを利用する方法について述べる。上記した第9発明は被験者の血液検体のみを利用する方法に該当する。「健常者との対比を行う方法」において上述した用語は、以下の説明においても基本的に同様の意義で用いる。

30

【0116】

本方法の発明は、前記被験者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量及び未処理セロトニントランスポーター量を利用する。一方、健常者の血液検体は不要であり、簡便な方法である。

【0117】

本方法の発明は、前記被験者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量が、未処理セロトニントランスポーター量の1.7倍以下となる場合に被験者がうつ病であると決定する。好ましくは、未処理セロトニントランスポーター量の1.3倍以下となる場合に被験者がうつ病であると決定する。より好ましくは、未処理セロトニントランスポーター量の1.1倍以下となる場合に被験者がうつ病であると決定する。本方法の発明では、未処理及び阻害剤処理の血液検体間のセロトニントランスポーターの存在量の相違を一定の大きさで把握することが重要である。よって、演算手法が異なれば、異なる値であっても「1.7倍以下」等に該当する場合がある。

40

また、対比の演算手法を変更すれば、「1.7倍以下」等の基準は変わりうる。よって、本方法の発明は、未処理セロトニントランスポーター量と阻害剤処理セロトニントランスポーター量とを求め、これらからうつ病を診断又は決定しようとする方法であって、上記本方法の発明の演算に整合できる実施形態をも含む。

50

【0118】

本願発明者の発見事実に基づけば、プロテアソーム阻害剤の作用によるセロトニントランスポーターの増加が認められなくなるほど、もしくはユビキチン化されたセロトニントランスポーターの割合が低くなるほど、うつ病を患っている可能性が高くなると考えられる。よって、被験者から採取した血液検体から得た阻害剤処理セロトニントランスポーター量が未処理セロトニントランスポーター量に近づくほど、うつ病を患っている可能性が高くなると考えられる。

【0119】

新規マーカーを利用する第二の方法の発明は、別の実施態様とすることもできる。上記した「新規マーカーを利用する方法」における別の実施態様の記載を参照できる。

10

上記した新規マーカーを利用する方法、及び新規マーカーを利用する第二の方法は、うつ病の診断の補助として利用してもよい。

【0120】

〔セロトニントランスポーター分析キット〕

セロトニントランスポーター分析キットは少なくともプロテアソーム阻害剤及び抗セロトニントランスポーター抗体を含む。他の物と組み合わせてこれらを使用しても良い。

【0121】

これらの使用順序は特に限定されない。これらを用いて上記未処理セロトニントランスポーター量と阻害剤処理セロトニントランスポーター量を測定することが好ましい。

【0122】

セロトニントランスポーター分析キットは、検体に含まれるセロトニントランスポーター量を分析するのに適している。検体に含まれるセロトニントランスポーターの絶対量の測定にも適している。

20

【0123】

本発明のキットにおける上記検体はセロトニントランスポーターを含む限り特に限定されない。上記検体にはユビキチン化されたセロトニントランスポーターが含まれていてもよい。上記検体は動物、植物、微生物、再生医療技術の応用により取得した物等を限定なく含む。また、細胞、組織、器官、個体の別も限定されず、適宜選択可能である。動物から得られる検体が好ましく、動物の体液及び動物の組織若しくは器官のホモジネートがより好ましく、血液が更に好ましく、血液から分画した血小板画分、リンパ球を含む白血球画分が更に好ましく、血小板画分、リンパ球画分が特に好ましい。検体は公知の常法により適宜取得可能である。

30

【0124】

本発明のキットの用途、本発明のキットに含まれる抗セロトニントランスポーター抗体、プロテアソーム阻害剤、及び付加的な物品に関しては、上記「ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キット」における記載を参照できる。

【実施例】

【0125】

以下に、本発明の実施例を説明する。本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されない。

40

【0126】

(A) 方法と材料

〔(1) MAGE-D1 (Melanoma antigen gene-D1) 遺伝子欠損マウスの作製〕

MAGE-D1 遺伝子 (Gene bank: NM_019791.2) エキソンを薬物 (G418) 耐性遺伝子 (GenBank: U00004.1) に相同組換えするターゲットベクター (Stratagene: pBlueScript) を 129 Svj マウス由来の胚性幹 (ES) 細胞 (独立行政法人 国立長寿医療研究センター研究所より入手) にエレクトロポレーションし、薬物耐性コロニーを選択した。当該選択した耐性コロニーからサザンブロッティングにより相同組換え体の同定を行った。当該同定した目的

50

の相同組換えES細胞クローンをC57BL/6Jマウスの胚盤胞期胚に注入し、キメラマウスを作製した。当該キメラマウスを野生型C57BL/6Jマウスと交配し、F1世代のヘテロ型MAGE-D1遺伝子欠損マウスを作製した。野生型C57BL/6Jとヘテロ型MAGE-D1遺伝子欠損マウスをF10世代まで交配させ、99.9パーセント（一度のC57BL/6Jマウスとの交配により、生まれてくるマウスの約半分の遺伝子が交配に使用したC57BL/6Jマウス由来となる。つまり、C57BL/6Jマウスとn回交配することで、約 $[1 - (1/2)^{n+1}] \times 100\%$ がC57BL/6Jマウス由来の遺伝子になると考えられる。）のC57BL/6Jの遺伝的背景をもつマウスを用いた。当該遺伝的背景をもつマウスをMAGE-D1遺伝子欠損マウス（以下、モデルマウスとも称する。）として以下の試験に用いた。

10

【0127】

〔(2)リコンビナントMAGE-D1ベクターおよびセロトニントランスポーター恒常発現細胞株の作製〕

マウスcDNAライブラリーからクローニングしたMAGE-D1遺伝子(Gene bank:NM_019791.2)の全長はA型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)配列(当該配列を下記配列番号8に示す。)タグ遺伝子(当該遺伝子の配列を下記配列番号1に示す。)と結合し、pcDNA3ベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)に組込んだ。

配列番号1: 5' TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC 3'

配列番号8: チロシン プロリン チロシン アスパラギン酸 バリン プロリン アスパラギン酸 チロシン アラニン

20

【0128】

ラットcDNAライブラリーからクローニングしたセロトニントランスポーター(以下SERTとも称する。)遺伝子(ラット:Gene bank:NM_013034.3。参考として、マウス:同データベース:NM_010484.2)はpcDNA3ベクターに組込んだ。

【0129】

チャイニーズハムスター卵巣細胞にセロトニントランスポーター遺伝子を上記したセロトニントランスポーター遺伝子を組込んだpcDNA3ベクターをFugen6(Rosche)により遺伝子導入し、セロトニントランスポーター遺伝子恒常発現細胞株を作製した。

30

【0130】

また、セロトニントランスポーター遺伝子恒常発現細胞株へのMAGE-D1遺伝子導入には、上記したMAGE-D1遺伝子及びHAタグ遺伝子を組込んだpcDNA3ベクターを使用し、FuGENE6(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて行った。

【0131】

〔(3)強制水泳試験によるうつ病様行動の評価〕

実験装置・手順:水槽(直径15cm x 高さ20cm)に水(水温約22 x 深さ13cm)を入れたものを実験装置とした。水槽に対照である野生型C57BL/6Jマウス又はモデルマウスを入れ、その直後から1分間隔で10分間、無動時間をScant MV-10 AQ(Brain Science・idea, Osaka, Japan)によって測定した。

40

【0132】

0.3%カルボキシメチルセルロースナトリウムで懸濁した5又は10mg/kgセルトラリン(Pfizer, Grotton, CT)および生理食塩水で溶解した10又は20mg/kgイミプラミン(Sigma, St. Louis, MO)は本試験30分前に腹腔内投与した。また、コントロールとして溶媒を腹腔内投与した。

【0133】

〔(4)In vivo マイクロダイアリシス法によるセロトニン遊離能の評価〕

50

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下のマウスを脳固定器に固定し、脳地図 (Franklin and Paxinos, 1997) を参考に、ガイドカニューレ (AG-6, EICOM Corp., Kyoto, Japan) を前頭皮質 (頭蓋の十字縫合から吻側: 1.7 mm 右側: +1.0 mm 深さ: -1.5 mm) に 15° の角度をつけて挿入した。ガイドカニューレを歯科用セメント (SHOFU Inc., Kyoto, Japan) により頭蓋骨に固定した。

【0134】

手術翌日にガイドカニューレからダイアリシスプローブ (A-I-6-1, 1 mm membrane length, EICOM Corp.) を前頭皮質に挿入したマウスをアクリルケース (30 cm x 30 cm x 35 cm) の中に入れ、自由に行動できるようにした。リンゲル液 (NaCl: 147 mM, KCl: 4 mM, CaCl₂: 2.3 mM) を 1.0 μl/min の流速にてプローブ内に灌流した。灌流液は 10 分ごとに回収し、回収した液中のセロトニン含量を高速液体クロマトグラフィー (HTEC-500, EICOM Corp.) により定量した。移動相は 1% (v/v) メタノール、デカンスルホン酸ナトリウム (SDS, 500 mg/L) および EDTA・2Na (50 mg/L) を含む 99% (v/v) 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を使用し、流速 500 μl/min で通液した。分離カラム (EICOMPAK PP-ODS, 30 x 4.6 mm phi, EICOM Corp.)、プレカラム (EICOM PREPAK SET CA-ODS, EICOM Corp.) を用いて分析し、検出には作用電極にグラファイト電極 (WE-3G) を備えた電気化学検出器を用い、設定加電圧を +400 mV vs Ag/AgCl に設定した。

【0135】

タイムスケジュールは、細胞外セロトニン遊離量が安定した (-60 分 ~ 0 分) 後、高カリウムリンゲル液 (NaCl: 101 mM, KCl: 50 mM, CaCl₂: 2.3 mM) をプローブ内に 20 分間灌流し (0 ~ 20 分)、その後灌流液を上記リンゲル液に戻して 1 時間まで細胞外セロトニン遊離量を測定した。

【0136】

〔(5) ウエスタンブロットティング法によるセロトニントランスポーター蛋白質発現量の評価〕

マウス脳サンプル、細胞および株化リンパ球は溶解バッファー [lysis buffer; 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% (w/v) Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 0.1% (w/v) SDS, 1% (w/v) sodium deoxycholate, 0.5 mM dithiothreitol, 10 mM sodium pyrophosphate decahydrate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/mL aprotinin, 10 μg/mL leupeptin, and 10 μg/mL pepstatin (pH 7.4)] 中 4 でソニケーターにより超音波破碎し、これらの操作によりホモジネートを得た。ホモジネートを 4、13000 x g で 20 分間遠心分離し、得られた上清を使用した。蛋白質量を調整した各上清サンプルにサンプルバッファー [sample buffer; 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) glycerol, 0.002% (w/v) bromophenol blue, and 5% (w/v) 2-mercaptoethanol] を加えた後、95 で 5 分間煮沸した。その後蛋白質 (20 μg) は 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、ポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) へ蛋白質を転写し、Detector Block Kit (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) を加えてブロッキングした。PVDF 膜にセロトニントランスポーター蛋白質に対する 1 次抗体 (anti-SERT) (Millipore, Billerica, MA) を加え、冷蔵

10

20

30

40

50

庫内(4)にて一晩静置した後、2次抗体(HRP-conjugated anti-rabbit IgG)(Kirkegaard and Perry Laboratories)を加え、室温にて3時間静置した。ウエスタンブロッティング検出試薬のECL(GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA)を用いて免疫複合体による発光を検出し、その発現量を発光による強度の画像解析により算出した。

【0137】

次いで、内因性標準物質のアクチン蛋白質の発現量を調べるため、ストリッピングを行い、1次抗体(anti-actin)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)を加え、インキュベーションした。結果は、得られたセロトニントランスポーター蛋白質のバンドをアクチン蛋白質のバンドで補正し、コントロール群に対する発現量を百分率(%)として示した。

10

【0138】

〔(6)ユビキチン化セロトニントランスポーター蛋白質発現量の評価〕

上記A(5)に記載の手法に従い、溶解バッファー[lysis buffer]でホモジナイズしたホモジネートからUbiQapture-Q kit(Enzo Life Sciences International, Inc, Plymouth Meeting, PA)を用いてユビキチン化蛋白質を単離し、上記A(5)と同様の条件のウエスタンブロット法によりユビキチン化セロトニントランスポーター蛋白質を検出した。

【0139】

〔(7)免疫沈降によるMAGE-D1蛋白質とセロトニントランスポーター蛋白質の結合の評価〕

20

上記A(5)と同様の条件で調製した脳もしくは培養細胞のホモジネートにHAタグ蛋白質に対する抗体anti-HA-tag(Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan)もしくはセロトニントランスポーター蛋白質に対する抗体anti-SERTとともにdynabeads protein A(Invitrogen)を加えて、回転下でインキュベートすることでdynabeadsと抗体、さらに抗体が認識するサンプル中の抗原(HAタグのついたMAGE-D1蛋白質もしくはセロトニントランスポーター蛋白質)による複合体であるdynabeads-抗原抗体複合体を形成させた。当該Dynabeads-抗原抗体複合体を上記A(5)と同様の条件でサンプルバッファー中で加熱し、複合体をdynabeadsから溶出させた。当該溶出サンプルに対して上記A(5)と同様の条件で抗体anti-SERTもしくは抗体anti-MAGE-D1(Millipore)を用いた上記のウエスタンブロット法を行った。

30

【0140】

〔(8)セロトニントランスポーターmRNAの定量的評価〕

対照である野生型C57BL/6Jマウス及びモデルマウスの前頭皮質からtotal RNAを抽出し、逆転写酵素により合成したcDNAをリアルタイムRT-PCRのテンプレートとして用いた。mRNA発現量はTaqmanプローブ法により定量した。SERT遺伝子については以下の配列番号2及び3に示すプライマー、並びに以下の配列番号4に示すTaqmanプローブを用いた。

40

配列番号2: 5' - GGATTTCCCTCCTGTCCTGTCATTGG - 3'

配列番号3: 5' - CCACCAATTCTGGTAGCATATGTAGG - 3'

配列番号4: 5' - CCGTGGACCTGGGCAACATCTGGC - 3'

【0141】

また、内部標準として使用したベータアクチンについては以下の配列番号5及び6に示すプライマー、並びに以下の配列番号7に示すTaqmanプローブを用いた。

配列番号5: 5' - GGGCTATGCTCTCCCTCACG - 3'

配列番号6: 5' - GTCACGCACGATTTCCCTCTC - 3'

配列番号7: 5' - CCTGCGTCTGGACCTGGCTGGC - 3'

50

なお、万が一実施例に記載の配列と配列表に記載の配列に齟齬がある場合、本実施例に記載の配列が優先する。

【0142】

〔(9)セロトニン再取り込み活性測定によるセロトニントランスポーター機能の評価〕
24ウエルプレートにセロトニントランスポーター遺伝子恒常発現細胞株を播種し、MAGE-D1遺伝子を遺伝子導入した。遺伝子導入処理後48時間後に放射標識した $[^3\text{H}]$ セロトニンを終濃度20nMになるようにKrebs-Ringer HEPESバッファー〔130mM NaCl, 1.3mM KCl, 2.2mM CaCl_2 , 1.2mM MgSO_4 , 1.2mM KH_2PO_4 , 1.8g/L glucose, 10mM HEPES (pH7.4)〕中の細胞に添加し、37℃で10分間インキュベートした。バッファー中の余剰 $[^3\text{H}]$ セロトニンを除去し、細胞を1N NaOHにて溶解した。液体シンチレーションカウンターにより、細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ セロトニンをカウントすることで取り込み活性を評価した。 $[^3\text{H}]$ セロトニンと共に様々な濃度の未標識セロトニンを加え、反応速度分析により結合親和性(Km)・最大結合量(Vmax)値を求めた。

10

【0143】

〔(10)健常者およびうつ病患者血液からの株化リンパ球の作製〕
健常者、並びに、選択的セロトニン再取り込み阻害薬である抗うつ薬フルボキサミンの効果があったうつ病患者及びその効果が無かったうつ病患者を対象とした。ハミルトンうつ病評価尺度(Hamilton Depression Scale: HAM-D)を判断基準として、当該うつ病患者は医師によりうつ病であると診断された者である。当該健常者は、医師により健常者であると判断された者である。

20

【0144】

無菌的に上記各対象者から採血した血液を滅菌した生理食塩水で2倍希釈した。次いで、希釈した当該血液をFicoll-Paque液(GEヘルスケア, Uppsala, Sweden)を3.5ml入れたチューブに静かに重層し、600xgで30分間遠心分離した。次いで、当該遠心分離したサンプルに認められる中間部の白い単核球層及びそのすぐ下層のFicoll-Paque液層を回収した。次いで、当該回収したサンプルを生理食塩水で懸濁し、400xgで30分間遠心分離した。次いで、当該遠心分離により得られた沈渣に生理食塩水を加えて240xgで5分間遠心分離した。次いで、当該遠心分離により得られた沈渣に液体培地(RPMI1640)を加えて再度240xgで5分間遠心分離した。次いで、当該遠心分離で得られた沈渣をリンパ球画分とし、20%胎児ウシ血清、20%Epstein-Barr virusウイルス放出細胞株(B95-8)の培養上清、と2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ シクロスポリンAを加えたRPMI1640を加えて培養した。1週間以上培養し、増殖が認められたものを株化リンパ球とし、10%胎児ウシ血清を加えたRPMI1640を用いて継代培養した。各対象者の血液から調製した株化リンパ球に含まれるセロトニントランスポーター蛋白質発現量の評価、ユビキチン化セロトニントランスポーター蛋白質発現量の評価は上記A(5)、A(6)と同様の手順で行った。

30

【0145】

(B)結果
〔MAGE-D1遺伝子欠損マウス〕
本実施例においては、モデル動物としてMAGE-D1遺伝子欠損マウスを使用した。うつ病様の行動評価として強制水泳試験を用いた。水を入れた狭いシリンダーに入れたマウスが逃避不可能であることを認知し、水に浮き無動状態になっている時間を意欲の低下として評価するものである。当該モデルマウスは強制水泳試験においては無動時間の延長から意欲の低下が認められ、その無動時間の延長は選択的セロトニン再取り込み阻害薬であるサートラリンおよび三環系抗うつ薬であるイミプラミンによって、ともに有意に用量依存的に緩解された(図1)。各試験は3連行い、図1は平均値にて作成した。無動時間割合の平均は、セルトラリン投与試験では、対照マウスは0mg/kgで45.7%、5

40

50

mg/kgで37.4%、10mg/kgで37.7%であった。モデルマウスは0mg/kgで64.5%、5mg/kgで56.3%、10mg/kgで45.7%であった。イミプラミン投与試験では、対照マウスは0mg/kgで41.7%、10mg/kgで47.7%、20mg/kgで39.0%であった。モデルマウスは0mg/kgで7.0%、10mg/kgで60.2%、20mg/kgで40.6%であった。

【0146】

モデルマウスはヒト抗うつ薬に強い応答性を示すうつ様行動を示すことが示唆された。モデルマウスはヒト抗うつ薬によってうつ病様の行動が緩解されるので、モデルマウスで確認される効果はヒトにおいても有効であると合理的に推測される。さらに、うつ病のメカニズムについても、モデルマウスとヒトで共通点があると合理的に推測される。

10

【0147】

うつ病の病態にモノアミン仮説があり、特にセロトニン作動性神経系は抗うつ薬の標的として注目されている。モデルマウスのセロトニン作動性神経系の機能についてマイクロダイアリシス法を用いて評価した。モデルマウスの前頭皮質において、高カリウム刺激による細胞外セロトニン遊離量の増加は対照マウスと比較して有意に低下していた(図2)。

【0148】

モデルマウス及び対照マウスについて各5連試験を行い、図2は平均値にて作成した。基礎遊離量とは、-60分~-20分まで、3回に分けて、マウス脳からの流速1 μ l/minの灌流液を10分間回収した液中のセロトニン濃度の平均であり、モデルマウスは0.46 \pm 0.21 pmol/10 μ l/10min、対照マウスは0.55 \pm 0.13 pmol/10 μ l/10minであり、図2は基礎遊離量に対する割合で示した。

20

【0149】

細胞外セロトニン量の平均は、対照マウスは0分(高カリウム刺激付与直後)で275.9%、20分で165.2%、40分で152.0%、60分で169.9%であった。モデルマウスは0分で146.5%、20分で128.1%、40分で101.2%、60分で97.5%であった。モデルマウスにおいてセロトニン作動性神経系の機能低下が示唆された。

【0150】

〔MAGE-D1遺伝子過剰発現系〕

上記A(2)に記載の手順でセロトニントランスポーター遺伝子恒常発現細胞株にHAタグ付きのMAGE-D1遺伝子を遺伝子導入により強制発現させ、MAGE-D1遺伝子過剰発現系として使用した。コントロールとしてHAタグ遺伝子のみ(MAGE-D1遺伝子を持たない。)を強制発現するpCDNA3ベクターを遺伝子導入した。anti-MAGE-D1抗体を使用したウエスタンブロット法(上記A(5)と同様の条件)によりMAGE-D1遺伝子過剰発現系ではMAGE-D1蛋白質(96kD)の過剰発現が認められ、MAGE-D1遺伝子過剰発現の影響を検討するのに十分な系であることを確認できた(図3)。MAGE-D1遺伝子過剰発現による細胞生存への顕著な影響は認められなかった。

30

40

【0151】

〔実施例1: MAGE-D1遺伝子欠損マウスにおけるセロトニントランスポーターの発現〕

モデルマウス及び対照である野生型C57BL/6Jを用い、モデルマウスにおけるセロトニン作動性神経系の機能低下が何によるかについて、前頭皮質のセロトニントランスポーター蛋白質の発現変化について上記A(5)に記載のウエスタンブロット法および上記A(7)に記載の免疫染色で検討したところ、モデルマウスの前頭皮質においてセロトニントランスポーター蛋白質(76kD)量の増加が認められた(図4a: 対照マウスに対して127.4%)。このようなセロトニントランスポーター蛋白質量の増加における転写調節の関与について検討するため、上記A(8)に記載のリアルタイムPCR法

50

にてセロトニントランスポーターmRNAを定量した。セロトニントランスポーターmRNA量はモデルマウスと対照マウスとで差が認められなかった(図4b:対照マウスに対して77.5%)。一方、上記A(6)に記載の手法にて、セロトニントランスポーター蛋白質のタンパク分解の関与についてそのユビキチン化を検討したところ、モデルマウスにおいて有意なユビキチン化セロトニントランスポーター蛋白質の低下が認められた(図4c:対照マウスに対して57.6%)。MAGE-D1遺伝子欠損によりユビキチン化を介したセロトニントランスポーター蛋白質の代謝が低下し、モデルマウスにおいてセロトニントランスポーター蛋白質量が増加することが示唆された。

【0152】

図4a~cに結果を記載した上記試験はモデルマウス及び対照マウスについて各3連試験を行い、試験結果は平均値にて記載した。

【0153】

〔実施例2:MAGE-D1蛋白質とセロトニントランスポーター蛋白質の相互作用〕

MAGE-D1蛋白質とセロトニントランスポーター蛋白質の相互作用として、それらの結合について、免疫沈降法により解析を行った。モデルマウス脳のホモジネートを上記A(5)に記載の手法に従って調製し、dynabeads protein Aとanti-SERT抗体を使用して免疫沈降を行った。セロトニントランスポーター蛋白質と共沈したMAGE-D1蛋白質をanti-MAGE-D1抗体を使用したウエスタンブロット法により検出した(図5中央レーン)。

【0154】

HAタグ付きMAGE-D1遺伝子を遺伝子導入したセロトニントランスポーター遺伝子恒常発現細胞株のホモジネートを上記モデルマウスの脳のホモジネートと同様の手法で調製し、dynabeads protein Aとanti-SERT抗体もしくはanti-HA抗体を使用して免疫沈降を行った。セロトニントランスポーター蛋白質と共沈したMAGE-D1蛋白質をanti-HA抗体を使用し上記A(5)と同様の条件のウエスタンブロット法により検出した(図6a)。同様に、MAGE-D1蛋白質と共沈したセロトニントランスポーター蛋白質をanti-SERT抗体を使用した上記A(5)と同様の条件のウエスタンブロット法により検出した(図6b)。

【0155】

MAGE-D1蛋白質とセロトニントランスポーター蛋白質が結合し、相互作用していることが示唆された。

【0156】

〔実施例3:MAGE-D1蛋白質とセロトニントランスポーター蛋白質の相互作用2〕

MAGE-D1蛋白質は特有のN末端ドメイン、トリプトファン-グルタミン-x-プロリン-x-x(WQxPx)反復ドメイン、C末端側にネクジンホモロジー(NHD)ドメインを含む(図7a「MAGE-D1」に概念図を示す)。そこで、セロトニントランスポーター蛋白質との結合に重要なMAGE-D1蛋白質のドメインの特定を行った。上記A(2)と同様の手法により、それぞれのHAタグ付きのMAGE-D1部分コンストラクト遺伝子を発現するベクター(MAGE-D1-N、MAGE-D1-NHD、MAGE-D1-W:以上の部分コンストラクト遺伝子の概念図を図7aに示す。)を遺伝子導入したセロトニントランスポーター遺伝子恒常発現細胞株のホモジネートを上記A(5)と同様の手法により調製し、dynabeads protein Aとanti-HA抗体を使用して免疫沈降を行った。MAGE-D1-NHD蛋白質と共沈したセロトニントランスポーター蛋白質をanti-SERT抗体を使用したウエスタンブロット法により検出した(図7b)。MAGE-D1蛋白質はNHDドメインを介して、セロトニントランスポーター蛋白質と結合・相互作用していることが示唆された。

【0157】

〔実施例4:MAGE-D1遺伝子強制発現によるセロトニントランスポーター蛋白質への影響〕

10

20

30

40

50

上記 A (2) に記載の手順でセロトニントランスポーター遺伝子恒常発現細胞株に M A G E - D 1 遺伝子を遺伝子導入により強制発現させ、M A G E - D 1 蛋白質によるセロトニントランスポーター蛋白質発現量およびセロトニン再取り込み活性への影響について検討を行った。コントロール (M A G E - D 1⁻) は、セロトニントランスポーター遺伝子恒常発現細胞株とした。

【 0 1 5 8 】

M A G E - D 1 遺伝子導入処理後 4 8 時間後のセロトニントランスポーター遺伝子恒常発現細胞株において、a n t i - S E R T 抗体を使用した上記 A (5) と同様の条件のウエスタンブロット法により、M A G E - D 1 蛋白質の強制発現によりセロトニントランスポーター蛋白質の発現の減少が認められ (図 8 a、コントロールに対して 8 5 . 1 % であ

10

った。)、セロトニン再取り込み活性測定における反応速度分析により V m a x 値の低下が認められた (図 8 b) 。

各試験は 3 連行い、結果は平均値にて記載した。

【 0 1 5 9 】

〔実施例 5 : セロトニントランスポーターの分解における M A G E - D 1 蛋白質によるユビキチン化の関与〕

S E R T 蛋白質の代謝におけるプロテアソームの関与を検討するために、S E R T 遺伝子恒常発現細胞株に対するプロテアソーム阻害剤 (M G 1 3 2) の影響を検討した。

【 0 1 6 0 】

S E R T 遺伝子恒常発現細胞株 (図 9 では「コントロール」と表示する。) のメディウムに M G 1 3 2 (1 0、5 0 又は 1 0 0 μ M) を添加 (図 9 中「0」は添加無し) してから 4 8 時間後において、a n t i - S E R T 抗体を使用した上記 A (5) と同様の条件のウエスタンブロット法により高分子量 (1 0 0 k D 以上) の S E R T 蛋白質シグナルが認められた (図 9 上段「コントロール 1 0 0」のレーン) 。また、その様な高分子量の S E R T 蛋白質シグナルは M A G E - D 1 遺伝子の強制発現 (図 9 では「M A G E - D 1」と表示する。) によりさらに増加が認められた (図 9 上段「M A G E - D 1 1 0 0」のレーン) 。この高分子量の S E R T 蛋白質シグナルの同定を目的として、U b i Q a p t u r e Q k i t を用いて上記 A (6) の手順にてユビキチン化タンパク質を単離し、a n t i - S E R T 抗体を使用したウエスタンブロット法による解析を行った。その結果、高分子量の S E R T 蛋白質シグナルはユビキチン化された S E R T 蛋白質であることが

20

30

【 0 1 6 1 】

〔実施例 6 : うつ病患者由来の株化リンパ球におけるユビキチン化セロトニントランスポーター発現量およびプロテアソーム阻害剤によるセロトニントランスポーター発現量変化〕

ユビキチン化セロトニントランスポーター蛋白質は U b i Q a p t u r e - Q k i t を用いた免疫沈降によりユビキチン化蛋白質を単離した中から、セロトニントランスポーター蛋白質に対する抗体を用いたウエスタンブロットにより検出したバンド (7 6 k D) として判断した。健常者由来の株化リンパ球におけるユビキチン化セロトニントランスポーター発現量 (当該発現量をユビキチン化セロトニントランスポーター蛋白質量のコントロールとする。) と比較し、抗うつ薬フルボキサミンの効果があったうつ病患者由来のそれは 8 4 . 7 % であり有意差が認められなかったが、抗うつ薬の効果なかったうつ病患者由来のそれは 5 8 . 7 % であり有意に低かった (図 1 0 a) 。

40

【 0 1 6 2 】

継代培養に用いた細胞培養メディウムに M G 1 3 2 を終濃度 2 0 μ M になる様に添加し、その 4 時間後に株化リンパ球を回収する手順で各株化リンパ球の継代培地に M G 1 3 2 を添加する試験を行った。M G 1 3 2 を添加した試験における、健常者由来の株化リンパ

50

球におけるユビキチン化セロトニントランスポーター発現量は130.6%であった。当該試験において、健常者由来の株化リンパ球におけるユビキチン化セロトニントランスポーターの発現量と比較して、抗うつ薬フルボキサミンの効果があつたうつ病患者由来のそれは103.4%であり有意差が認められなかったが、抗うつ薬の効果がなかつたうつ病患者由来のそれは88.5%であり有意に低かつた(図10a)。

【0163】

健常者由来の株化リンパ球におけるセロトニントランスポーターの発現量(当該発現量をセロトニントランスポーター蛋白質量のコントロールとする。)と比較して、同株化リンパ球にMG132を添加したもののそれは173.8%に有意に増加した(図10b)。抗うつ薬の効果のあつたうつ病患者由来の株化リンパ球のセロトニントランスポーター発現量は109.5%であり、同株化リンパ球にMG132を添加したそれでは141.9%であった(図10b)。また、抗うつ薬の効果のなかつたうつ病患者由来の株化リンパ球のセロトニントランスポーター発現量は136.9%であり、同株化リンパ球にMG132を添加したそれでは143.6%であった(図10b)。これら抗うつ薬の効果の有無にかかわらずうつ病患者の株化リンパ球においてMG132添加によるセロトニントランスポーター発現量の有意な増加が認められなかった。上記各試験は6連行い、結果は平均値にて記載した。

【0164】

これらの結果から、抗うつ薬非応答性のうつ病患者由来の株化リンパ球においてユビキチン化セロトニントランスポーター発現量の低下が認められ、ユビキチン化を介したプロテアーゼによるセロトニントランスポーターの分解が低下した結果、プロテアーゼ阻害剤に応答したセロトニントランスポーター発現量の増加がうつ病患者由来の株化リンパ球において認められなかったと考えられる。

【0165】

上記MG132を添加しない試験の測定結果に基づいて算出したSERT蛋白質全量に対するユビキチン化SERT蛋白質量の比率(ユビキチン化SERT蛋白質量/SERT蛋白質全量)は、健常者由来の株化リンパ球と比較(当該健常者由来の株化リンパ球から算出したSERT蛋白質全量に対するユビキチン化SERT蛋白質量の比率をコントロールとする。)し、抗うつ薬応答性のうつ病患者由来の株化リンパ球で72.1%、抗うつ薬非応答性のうつ病患者由来の株化リンパ球で39.2%であった。うつ病患者由来の株化リンパ球におけるユビキチン化されたセロトニントランスポーター蛋白質の比率は、健常者における当該比率に比べて低レベルであった。

これら実験における有意差検定には一元配置分散分析及びポストホック解析であるFisher's PLSD法を用いた。

【0166】

なお、本実施例6において「SERT蛋白質全量」とは、抗体を用いた検出で検出されたSERT蛋白質の全量を意味し、ユビキチン化SERT蛋白質量も含む。

【0167】

セロトニントランスポーターはユビキチンが付加されることにより高分子量化しプロテアソームにより分解されると考えられる。

プロテアソーム阻害剤であるMG-132を添加することにより、セロトニントランスポーターの分解を抑制した場合の影響を検討した。健常者におけるセロトニントランスポーターの発現はMG-132の添加により増加した(図10b)。一方、抗うつ薬に応答性ならびに非応答性のうつ病患者におけるセロトニントランスポーターの発現はMG-132の添加による変化は認められなかった(図10b)。

【0168】

抗うつ薬に非応答性のうつ病患者におけるユビキチン化されたセロトニントランスポーターの発現は健常者におけるそれと比較して、有意に低かつた(図10a)。そのような変化はMG-132の添加時においても認められた(図10a)。

【0169】

10

20

30

40

50

セロトントランスポーターがユビキチン化されないと、体内に過剰のセロトントランスポーターが存在しシナプス間隙におけるセロトニン量が不十分になり、うつ病が引き起こされると考えられる。よって、MG-132 添加によるセロトントランスポーターの発現の増加が認められなくなるほど、もしくはユビキチン化されたセロトントランスポーターの割合が低くなるほど、うつ病を患っている可能性が高くなると考えられる。

【 0 1 7 0 】

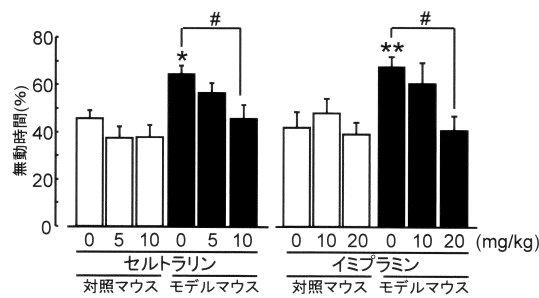
以上のことから、リンパ球、血小板ならびにそれを含む血液に含まれるユビキチン化セロトントラスポーターの定量ならびにプロテアーゼ阻害剤によるセロトントラスポーター量の変化はうつ病の決定法として有用である。

【 産業上の利用可能性 】

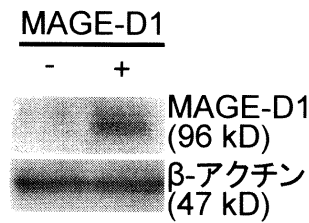
【 0 1 7 1 】

本発明により、有用な新規マーカーを利用する方法及びユビキチン化セロトントラスポーター分析キットが提供される。

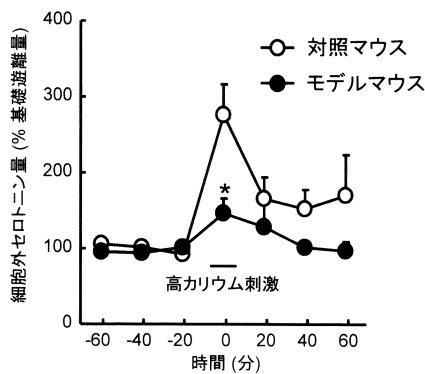
【 図 1 】



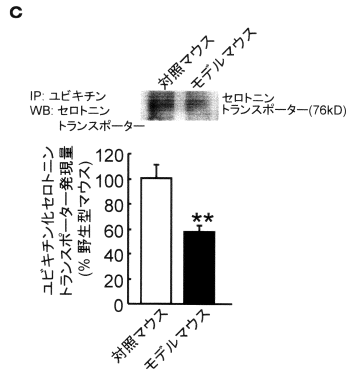
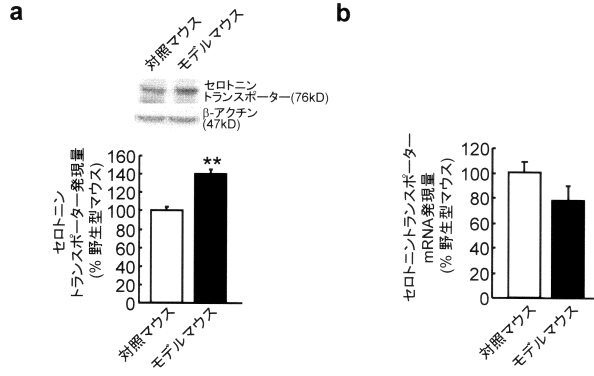
【 図 3 】



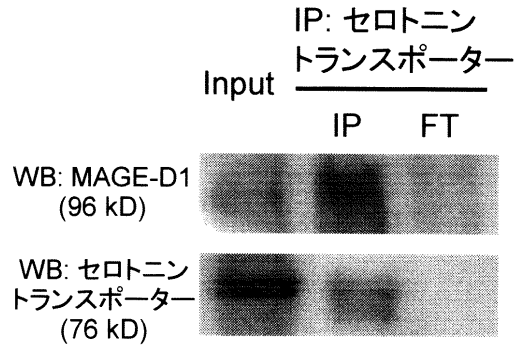
【 図 2 】



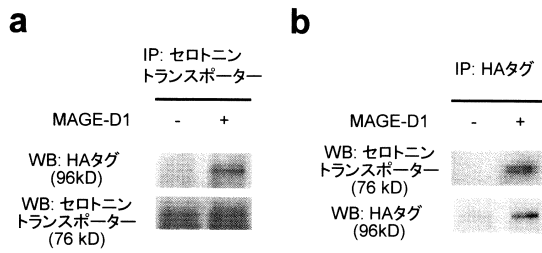
【 図 4 】



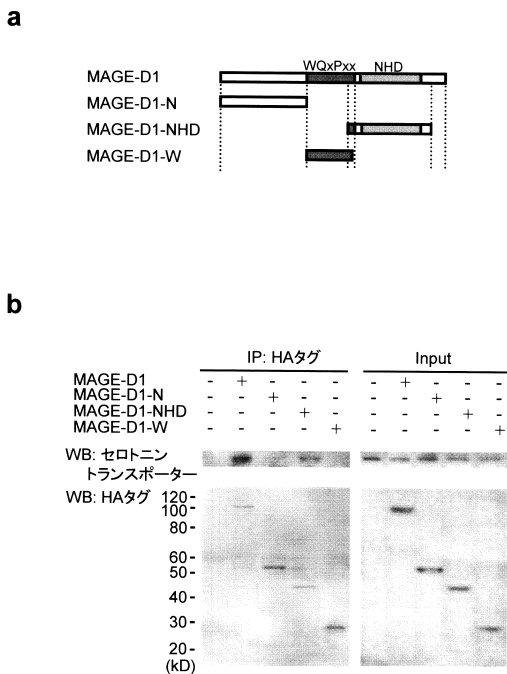
【 図 5 】



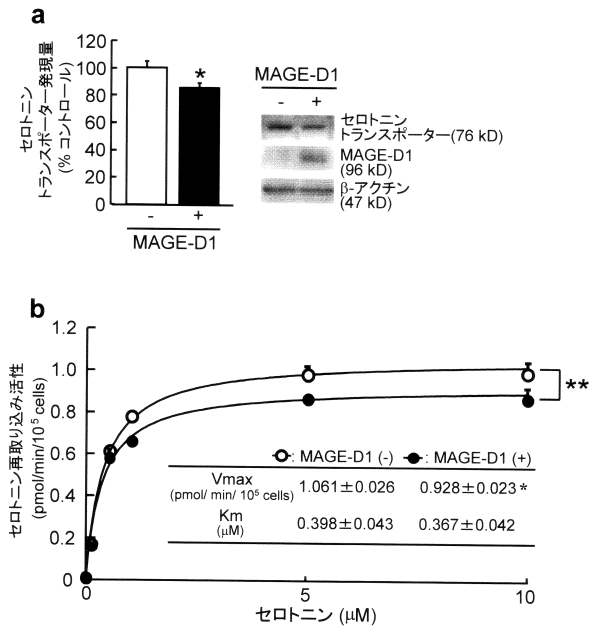
【 図 6 】



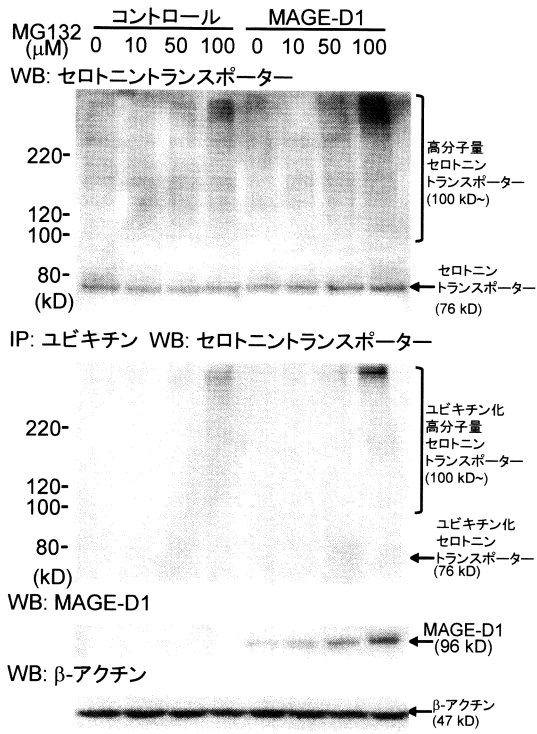
【 図 7 】



【 図 8 】



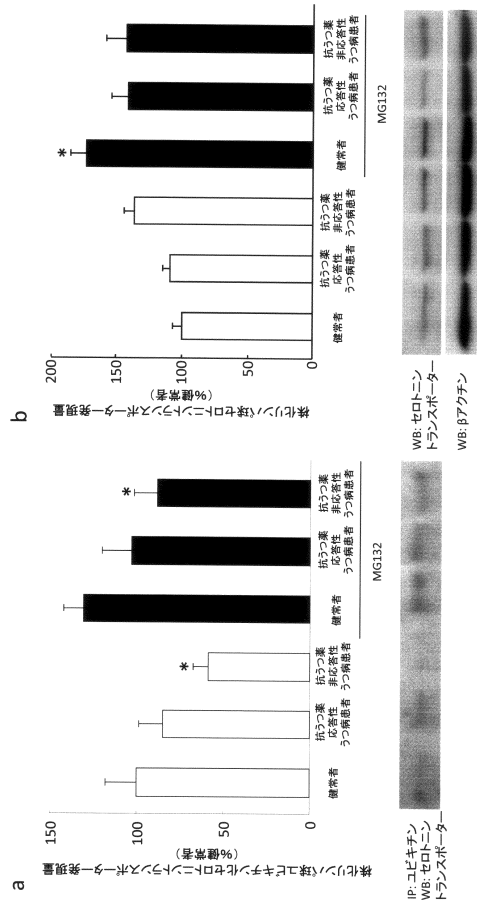
【 図 9 】



【 配列表 】

000607846600001.app

【 図 10 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2007/0199084 (US, A1)
特開2005-312435 (JP, A)
米国特許出願公開第2009/0233942 (US, A1)
米国特許出願公開第2005/0209181 (US, A1)
米国特許第444879 (US, A)
Hoyle, D. et al., Shared changes in gene expression in frontal cortex of four genetically modified mouse models of depression, *European Neuropsychopharmacology*, 2011年 1月, Vol.21, No.1, Page.3-10
MOURI Akihiro et al., MAGE-D1 knockout mice express depressive endophenotypes associated with downregulation of serotonin transporter, *J Pharmacol Sci*, 2012年 2月15日, Vol.118, No.Supplement 1, Page.99P
Akihiro Mouri, Aya Sasaki et al., MAGE-D1 Regulates Expression of Depression-Like Behavior through Serotonin Transporter Ubiquitylation, *The Journal of Neuroscience*, 2012年 3月, Vol.32, No.13, Page.4562-4580
C.-W. Tsao, Serotonin Transporter mRNA Expression is Decreased by Lamivudine and Ribavirin and Increased by interferon in Immune Cells, *Scand J Immunol*, 2006年, Vol.63 No.2, Page.106-15
Hedge, A. N. & DiAntonio, A., Ubiquitin and the synapse, *Nature Rev. Neurosci.*, 2002年, Vol.3, Page.854-861

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/68

G01N 33/53

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	5-羟色胺转运蛋白分析试剂盒和血液泛素化血清素转运蛋白分析试剂盒		
公开(公告)号	JP6078466B2	公开(公告)日	2017-02-08
申请号	JP2013524744	申请日	2012-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人名城大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人名城大学		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人名城大学		
[标]发明人	鍋島俊隆 毛利彰宏		
发明人	鍋島 俊隆 毛利 彰宏		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/942 C12Q1/6881 G01N33/6896 G01N2333/4703 G01N2440/36 G01N2800/304		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2011160052 2011-07-21 JP 2011228055 2011-10-17 JP		
其他公开文献	JPWO2013012038A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种新型标记物的利用方法，包括抑郁症的判定方法，和用于分析泛素化的5-羟色胺转运蛋白的试剂盒。[解决方案]一种用于确定抑郁症的方法，包括分析从受试者收集的血液样品中泛素化5-羟色胺转运蛋白的比例的步骤;和用于分析血液中的泛素化血清素转运蛋白的试剂盒，其包含泛素化蛋白质收集材料和抗血清素转运蛋白抗体，并且用于分析收集的血液样品中泛素化血清素转运蛋白的比例。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6078466号 (P6078466)
(45) 発行日 平成29年2月8日 (2017.2.8)	(24) 登録日 平成29年1月20日 (2017.1.20)	
(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)	F I G O I N 33/68 G O I N 33/53 D	
請求項の数 4 (全 29 頁)		
(21) 出願番号 特願2013-524744 (P2013-524744)	(73) 特許権者 599002043 学校法人 名城大学	
(86) (22) 出願日 平成24年7月19日 (2012.7.19)	愛知県名古屋市長区天白区堀釜口1-501	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2012/068348	(74) 代理人 110000497 特許業務法人 グランダム特許事務所	
(87) 国際公開番号 W02013/012038	(72) 発明者 鍋島 俊隆 愛知県名古屋市長区天白区八事山150番地 学校法人名城大学八事キャンパス内	
(87) 国際公開日 平成25年1月24日 (2013.1.24)	(72) 発明者 毛利 彰宏 愛知県名古屋市長区天白区八事山150番地 学校法人名城大学八事キャンパス内	
審査請求日 平成27年7月13日 (2015.7.13)	審査官 三木 隆	
(31) 優先権主張番号 特願2011-160052 (P2011-160052)		
(32) 優先日 平成23年7月21日 (2011.7.21)		
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号 特願2011-228055 (P2011-228055)		
(32) 優先日 平成23年10月17日 (2011.10.17)		
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		

(54) 【発明の名称】 セロトニントランスポーター分析キット及び血中スベキチン化セロトニントランスポーター分析キット

最終頁に続く