

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6456851号
(P6456851)

(45) 発行日 平成31年1月23日(2019.1.23)

(24) 登録日 平成30年12月28日(2018.12.28)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D

請求項の数 45 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2015-561851 (P2015-561851)	(73) 特許権者	515259155
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)		ピーター・スタイズ
(65) 公表番号	特表2016-514266 (P2016-514266A)		カナダ・アルバータ・T3Z・3M1・カルガリー・スプリングサイド・ストリート・43
(43) 公表日	平成28年5月19日 (2016.5.19)	(73) 特許権者	515259166
(86) 国際出願番号	PCT/CA2014/000250		シゲキ・ツツイ
(87) 国際公開番号	W02014/138919		カナダ・アルバータ・T3G・O B9・カルガリー・ロイヤル・オーク・ドライブ・ノースウエスト・79
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)	(74) 代理人	100108453
審査請求日	平成29年3月9日 (2017.3.9)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	13/833,008	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異常タンパク質凝集と関連する疾患を検出するための血液の分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象において異常タンパク質凝集と関連する疾患を発現する増大したリスクを対象が有するかを決定するインビトロ方法であって、

対象からの1種以上の非血漿血液成分を、病原性タンパク質凝集体と結合する立体構造感受性蛍光プローブと接触させる工程と、

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを発生させる工程であって、前記プローブが病原性タンパク質凝集体と結合した際に、立体構造感受性蛍光プローブの蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルが変化する工程と、

前記蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する対象に由来する参照非血漿血液成分と接触したプローブの1つ以上の参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルと比較する工程と

を含む、前記蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルと1つ以上の参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルとの対応が、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を発現する増大したリスクを有することを示す、方法。

【請求項2】

1種以上の非血漿血液成分が、赤血球、白血球及び血小板から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

非血漿血液成分が白血球である、請求項1または2に記載の方法。

10

20

【請求項4】

プローブが、K114、コンゴレッド、コンゴレッド誘導体、X34、BSB、FSB、IMSB、クリサミン-G、メトキシ-X34、メトキシ-X04、チオフラビン-T、チオフラビン-S、ピッツバーグ化合物B、チアジンレッドR、オーラミン-O、p-FTAA又はp-FTAAに関連する発光性共役ポリチオフェン(LCP)若しくは発光性共役オリゴチオフェン(LCO)である、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

プローブの蛍光を検出する工程が、場合により1つ以上の励起波長での一光子又は多光子励起を使用して誘発された、2つ以上の波長での蛍光発光シグナルの強度を検出する工程を含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項6】

a. 蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを発生させる工程と、
b. スペクトルアンミキシングを実施して、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルに寄与する個々の基準スペクトルの重み付けを決定する工程と、
c. 重み付けを使用して、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する確率を決定する工程と
を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

個々の基準スペクトルが、(a)異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することが知られている対象の試料、(b)健常対照対象の試料、及び/又は(c)プローブと接触していない試料から決定される、請求項6に記載の方法。

20

【請求項8】

スペクトルアンミキシングが、場合によってLevenberg-Marquardtアルゴリズムを使用する、線形代数的方法または非線形代数的方法を使用して実施される、請求項6又は7に記載の方法。

【請求項9】

蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを1つ以上の参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルと比較する工程が、機械学習、遺伝的アルゴリズム又は主成分分析を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

異常タンパク質凝集と関連する疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、軽度認知障害、脳アミロイド血管症、ミオパチー、ニューロパチー、脳外傷、外傷性脳損傷、前頭側頭型認知症、ピック病、多発性硬化症、プリオン病、ダウン症候群及び筋萎縮性側索硬化症(ALS)からなる群から選択される、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項11】

病原性タンパク質凝集体が、アミロイドタンパク質、場合により -アミロイド、 -シヌクレイン、ハンチンチン、タウタンパク質、過剰リン酸化タウタンパク質(pTau)、プリオンタンパク質、 B-クリスタリン(CRYAB)、デスミン、セレン含有タンパク質、アクチン、ミオシン及び/又はスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項12】

病原性タンパク質凝集体が -アミロイドを含み、疾患がアルツハイマー病である、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

対象からの白血球を病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程が、アルカリ性pHで実施され、場合によりpHが8超である、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

対象からの白血球を病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程が、

50

酸性pHで実施され、場合によりpHが6未満である、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

pHが10超、場合により約10.5である、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

2つ以上の励起波長で2つ以上の蛍光発光スペクトルを発生させる工程を含む、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

励起波長の少なくとも1つが、近紫外にあり、場合により約200nm～約400nmである、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

励起波長の少なくとも1つが、約300nm～約500nm、場合により約375nm又は約445nmである、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光を検出する工程が、約200nm～約2000nmの1つ又は複数の波長における蛍光発光の強度を測定する工程を含む、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの吸光度を検出する工程が、約200nm～約2000nmの1つ以上の波長の光の吸光度を測定する工程を含む、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光又は吸光度が、細胞数に対して正規化される、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程が、白血球、赤血球及び/または血小板の試料を含む二次元場の全て又は一部において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光又は吸光度を測定する工程を含む、請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

1種以上の非血漿血液成分が、赤血球、白血球及び血小板から選択され、異常タンパク質凝集と関連する疾患が、アルツハイマー病、軽度認知障害、脳アミロイド血管症、脳外傷、外傷性脳損傷及び多発性硬化症からなる群から選択される、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを最大強度に対して正規化した後、正規化した前記蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを、最大強度に対して正規化された1つ以上の参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルと比較する、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

対象からの血液試料中の病原性タンパク質凝集体を検出するためのインビトロ方法であって、

血液試料からの非血漿血液成分を、病原性タンパク質凝集体と結合する立体構造感受性蛍光プローブと接触させる工程と、

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程とを含む、方法。

【請求項26】

1種以上の非血漿血液成分が、赤血球、白血球及び血小板から選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

10

20

30

40

50

非血漿血液成分が白血球である、請求項25または26に記載の方法。

【請求項28】

プローブが、K114、コンゴレッド、コンゴレッド誘導体、X34、BSB、FSB、IMSB、クリサミン-G、メトキシ-X34、メトキシ-X04、チオフラビン-T、チオフラビン-S、ピッツバーグ化合物B、チアジンレッドR、オーラミン-O、p-FTAA又はp-FTAAに関連する発光性共役ポリチオフェン(LCP)若しくは発光性共役オリゴチオフェン(LCO)である、請求項25から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

非血漿血液成分と接触したプローブの蛍光又は吸光度を、非血漿血液成分の参照試料と接触したプローブの蛍光又は吸光度と比較する工程を更に含む、請求項25から28のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項30】

参照非血漿血液成分が、病原性タンパク質凝集体と関連する試料に由来し、非血漿血液成分の蛍光と参照非血漿血液成分の蛍光との対応が、試料中の病原性タンパク質凝集体の存在を示す、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

プローブの蛍光又は吸光度を検出する工程が、蛍光発光スペクトルを発生させる工程又は吸収スペクトルを発生させる工程を含む、請求項25から30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを、1つ以上の参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルと比較する工程を更に含む、請求項31に記載の方法。

20

【請求項33】

少なくとも1つの参照発光スペクトル又は参照吸収スペクトルが、病原性タンパク質凝集体と関連する参照非血漿血液成分を代表する蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルであり、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルと少なくとも1つの参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルとの対応が、試料が病原性タンパク質凝集体を有することを示す、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

a. 蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを発生させる工程と、
b. スペクトルアンミキシングを実施して、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルに寄与する個々の基準スペクトルの重み付けを決定する工程と、
c. 重み付けを使用して、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する確率を決定する工程と
を含む、請求項31から33のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項35】

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを最大強度に対して正規化した後、正規化した前記蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを、最大強度に対して正規化された1つ以上の参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルと比較する、請求項31～34のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項36】

病原性タンパク質凝集体が、アミロイドタンパク質、場合により -アミロイド、 -シヌクレイン、ハンチンチン、タウタンパク質、過剰リン酸化タウタンパク質(pTau)、プリオンタンパク質、 B-クリスタリン(CRYAB)、デスミン、セレン含有タンパク質、アクチン、ミオシン及び/又はスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を含む、請求項25から35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

病原性タンパク質凝集体が -アミロイドを含む、請求項25から36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

50

対象からの白血球を病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程が、アルカリ性pHで実施され、場合によりpHが8超である、請求項25から37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

pHが10超、場合により約10.5である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

2つ以上の励起波長で2つ以上の蛍光発光スペクトルを発生させる工程を含む、請求項25から39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項41】

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光を検出する工程が、約200nm～約200nm、場合により約400nm～約700nmの1つ以上の波長における蛍光発光の強度を測定する工程を含む、請求項25から40のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項42】

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの吸光度を検出する工程が、約200nm～約2000nm、場合により約400nm～約700nmの1つ以上の波長の光の吸光度を測定する工程を含む、請求項25から40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光又は吸光度が、細胞数に対して正規化される、請求項25から42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

20

病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程が、非血漿血液成分の試料を含む二次元場の全て又は一部において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光又は吸光度を測定する工程を含む、請求項25から43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

非血漿血液成分が白血球、赤血球及び/または血小板である、請求項25から44のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

30

本出願は、2013年3月15日に出願された米国特許出願第13/833,008号の優先権を主張するものであり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、異常タンパク質凝集と関連する疾患を検出するための血液の分析方法に関する。一実施形態において、異常タンパク質凝集と関連する疾患は、アルツハイマー病である。

【背景技術】

【0003】

アルツハイマー病(AD)は、世界中の高齢者集団における認知症の最大原因であり、3500万人を超える人々が罹患しており、有効な治療法が開発されなければ、2050年までに1億1500万人に達すると予想されている(Barnes及びYaffe、2011年)。この加齢性神経変性障害は、アミロイド(A)含有老人斑、神経原線維変化及び脳のシナプス消失によって病理学的に特徴付けられる(Selkoe、2001年)。ADが変性障害であることは明白であるが、免疫系の役割が顕著である(Britschgi及びWyss-Coray、2007年において概説されている)。ADにおいて、毒性Aペプチドは凝集してより高分子量の集合体となり、細胞外間隙だけでなく、脳の血管壁にも集合し(de la Torre、2002年; Deane及びZlokovic、2007年)、それらの透過性を増加させ(Nagababurら、2009年)、Tリンパ球の脳への移動を促進する(Farkasら、2003年)。マクロファージ/ミクログリアはAを取り込み、Aクリアランスにおいて重要な役割を果たす(Majumdarら、2008年; Mildnerら、2007年; Simardら、2006年)。好中球もまた、血液脳関門の破壊によってAD脳に浸潤する(Stamatovicら、2005年)。

40

50

【 0 0 0 4 】

多くの努力にもかかわらず、ADに対する治療法も、信頼性をもって確実に診断を確定する臨床検査さえもなく、脳組織の死後検査が、ADの診断を裏付ける現在唯一の確実な方法である。実際に、現在の診断基準は、「ほぼ確実なAD(Probable AD)」を確実性が最も高いカテゴリーとし(McKhannら、2011年)、これは生前診断の限界を示している。簡単で信頼性が高い検査が、いくつかの理由で重要であろう:登録された対象が確定診断を有するならば、治験はより信頼性が高く、より均一な集団の研究が可能となる。これが利用可能になれば、ADの診断基準をまだ満たしていない認知症のより軽度の症例(軽度認知障害)であっても、他の原因(例えば、血管性)と対比して早期ADとして正しく分類することができ、より良好な予後診断及び適切な治療の開始が可能となるであろう。

10

【 0 0 0 5 】

公衆衛生的観点から、AD脳の生化学変化(例えば、アミロイド沈着)は、臨床症状の数年からおそらく数十年前に始まることから、症状発現前の疾患を早期に検出して、利用可能ならば予防措置を開始することが可能であり得る。したがって、先進国がこの回避不能な流行に備えるに当たり、費用がかからず非侵襲的である迅速なAD検査の開発が最も重要である。

【 0 0 0 6 】

AD診断を裏付けるバイオマーカーの開発に多くの努力が注ぎ込まれた。血液においては、血漿中のA β レベルの測定が中心であった。A β ₄₀、A β ₄₂又はこれら2つの比のレベルは、信頼性をもって健常対照をAD患者から分離することができないので、これは信頼性が得られていない(Thambisetty及びLovestone、2010年)。他のアプローチとしては、血漿のプロテオミクス分析が挙げられるが、これは費用がかかり、複雑であり、ハイスループットなアッセイに適さず、まだ実験段階にある。A β 及び(リン酸化)タウレベルのCSF分析は、より強力な予測値を有する(van Rossumら、2012年; Senanarongら、2012年)が、血液と比較して侵襲的であり、正式な研究試験を除いて、ルーチンとなる可能性は低い。イメージングマーカー(MRI、fMRI、FDG-PET、アミロイド-PET)(Jack、2012年; Matsuda及びImabayashi、2012年)は全て、より費用がかかり、広く入手できず、非特異的(MRI)であるか、又は非常に特殊であって少数の施設でしか利用できない(例えば、アミロイド-PET)。したがって、AD及びADに進行するAD関連の軽度認知障害を診断するための簡単で、費用がかからない血液検査が、非常に望ましい。ヒト血液の小試料から検出を実施できれば、現行の方法よりも飛躍的に改善がもたらされ、簡単で、迅速なハイスループットスクリーニング法の開発への道が開かれるであろう。このような方法があれば、異常タンパク質凝集を特徴とする他の疾患にも適用できるであろう。

20

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 7 】

【特許文献1】W0200602069

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

発明者らは、異常タンパク質凝集と関連する疾患を検出するための、新規な血液の分析方法を記載する。実施例で述べる通り、本発明者らは、非血漿血液成分、例えば、循環血液の白血球及び血小板中において、アルツハイマー病、ウシ海綿状脳症(BSE)及び外傷性脳損傷を含むがこれらに限定されない疾患と関連する病原性タンパク質凝集体を検出することが可能であることを明らかにした。更にまた、病原性タンパク質凝集体を結合する蛍光プローブを用いる蛍光スペクトル技術の使用により、健常対照からの血液試料と、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する対象からの血液試料とが容易に区別されることを示した。したがって、病原性タンパク質凝集体を結合する蛍光プローブを用いる非血漿血液成分のスペクトル分析により、中枢神経系における異常タンパク質凝集と典型的に関連する疾患の検出が可能となる。トランスジェニック動物モデルを用いて、本明細書中に記

40

50

載した方法が、脳試料で病態が観察されると同時に疾患の進行中の早い時期に血液試料を使用して、アルツハイマー病を有する対象を特定できることも示した。

【課題を解決するための手段】

【0009】

したがって、本開示は、対象において異常タンパク質凝集と関連する疾患を検出する方法に関する。一実施形態において、この方法は、(a)対象からの非血漿血液成分を、病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程と、(b)病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程とを含み、非血漿血液成分中の病原性タンパク質凝集体の存在が、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す。

【0010】

本開示はまた、対象からの血液試料中の病原性タンパク質凝集体を検出するためのインビトロ方法に関する。一実施形態において、この方法は、(a)血液試料からの非血漿血液成分を、病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程と、(b)病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程とを含む。

【0011】

一実施形態において、本明細書中に記載した方法は、非血漿血液成分を病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程の前に、対象から血液試料を得る工程、及び血液試料から1種又は複数の非血漿血液成分を単離する工程を含む。一実施形態において、非血漿血液成分は、赤血球、白血球、微小胞及び血小板から選択される。好ましい一実施形態において、非血漿血液成分は白血球である。一実施形態において、方法は、パフ

【0012】

ィーコートは病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程の前に、対象から血液試料を得る工程、及び血液試料から白血球を単離する工程を含む。

【0013】

別の実施形態において、本明細書中に記載した方法は、パフイーコートの白血球を病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程の前に、対象からパフイーコートを含む血液試料を得る工程を含む。

【0014】

別の実施形態において、プローブは、蛍光プローブ、場合により立体構造感受性プローブである。場合により、プローブは、コンゴレッド、コンゴレッド誘導体、K114、X34、B SB、FSB、IMSB、クリサミン(Chrysamine)-G、メトキシ-X34、メトキシ-X04、チオフラビン-T、チオフラビン-S、ピッツバーグ化合物B、チアジンレッドR、オーラミン-O、p-FTAA又はp-FTAAに関連する発光性共役ポリチオフェン(LCP)若しくは発光性共役オリゴチオフェン(LCO)である。

【0015】

一実施形態において、プローブは、病原性タンパク質凝集体と選択的に結合する抗体を含む。場合により、抗体は、検出可能な標識、例えば、蛍光標識で標識される。一実施形態において、プローブは、抗-アミロイド抗体である。一実施形態において、プローブは、抗Tau抗体又は抗過剰リン酸化Tau抗体である。

【0016】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程は、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光又は吸光度を検出する工程を含む。

【0017】

別の実施形態において、プローブの蛍光又は吸光度を検出する工程は、蛍光シグナルの強度を検出する工程、蛍光発光スペクトルを発生させる工程及び/又は吸収スペクトルを発生させる工程を含む。一実施形態において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光を検出する工程は、2つ以上の波長での蛍光シグナルの強度、又は2つ以上の波長

10

20

30

40

50

での病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの吸収を検出する工程を含む。

【0018】

別の実施形態において、方法は、非血漿血液成分と接触したプローブの蛍光又は吸光度を、参照非血漿血液成分と接触した参照プローブの蛍光又は吸光度と比較する工程を更に含む。場合により、参照非血漿血液成分は、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する参照対象に由来し、対象の非血漿血液成分の蛍光又は吸光度と参照非血漿血液成分の蛍光又は吸光度との対応が、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す。

【0019】

別の実施形態において、プローブの蛍光又は吸光度を検出する工程は、2つ以上の波長での蛍光発光シグナルの強度を検出する工程、2つ以上の波長での測定値を含む蛍光発光スペクトルを発生させる工程、又は2つ以上の波長での測定値を含む吸収スペクトルを発生させる工程を含む。

10

【0020】

別の実施形態において、方法は、蛍光発光スペクトルを1つ又は複数の参照蛍光発光スペクトルと比較する工程を更に含む。場合により、少なくとも1つの参照発光スペクトルは、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する参照対象に由来する参照非血漿血液成分からの蛍光発光スペクトルであり、蛍光発光スペクトルと少なくとも1つの参照蛍光発光スペクトルとの対応が、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す。或いは、少なくとも1つの参照発光スペクトルは、健常対照である参照対象、例えば、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さない対象に由来する参照非血漿血液成分からの蛍光発光スペクトルであり、蛍光発光スペクトルと少なくとも1つの参照蛍光発光スペクトルとの対応が、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さないことを示す。場合により、参照発光スペクトルは、非神経性疾患対照を含む。

20

【0021】

別の実施形態において、方法は、吸収スペクトルを1つ又は複数の参照吸収スペクトルと比較する工程を更に含む。場合により、少なくとも1つの参照吸収スペクトルは、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する参照対象に由来する参照非血漿血液成分からの吸収スペクトルであり、吸収スペクトルと少なくとも1つの参照吸収スペクトルとの対応が、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す。或いは、少なくとも1つの参照吸収スペクトルは、健常対照である参照対象、例えば、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さない対象に由来する参照非血漿血液成分からの吸収スペクトルであり、吸収スペクトルと少なくとも1つの参照吸収スペクトルとの対応が、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さないことを示す。

30

【0022】

当業者ならば、一部の実施形態において、対象の非血漿血液成分の蛍光スペクトル又は吸収スペクトルと参照非血漿血液成分の蛍光スペクトル又は吸光度スペクトルとの差異又は類似性が、参照非血漿血液成分の疾患状態に応じて、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する又は有さないことを示し得ることが分かるであろう。同様に、対象の非血漿血液成分の蛍光スペクトル又は吸収スペクトルと参照非血漿血液成分の蛍光スペクトル又は吸光度スペクトルとの差異又は類似性は、参照非血漿血液試料が病原性タンパク質凝集体を有するかどうかによって、試料が病原性タンパク質凝集体を有する又は病原性タンパク質凝集体を有さないことを示し得る。

40

【0023】

別の実施形態において、方法は複数の蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを複数の参照スペクトルと比較する工程を含む。例えば、一実施形態において、2つ以上の蛍光発光スペクトルを、2つ以上の異なる励起波長を使用して発生させ、同一の又は同様な励起波長を使用して発生させた2つ以上の参照スペクトルと比較する。

【0024】

別の実施形態において、方法は、

(a) 蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを発生させる工程と、

50

(b)スペクトルアンミキシングを実施して、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルに寄与する個々の基準スペクトルの重み付けを決定する工程と、

(c)重み付けを使用して、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する確率を決定する工程、又は重み付けを使用して、試料が病原性タンパク質凝集体を有する確率を決定する工程とを更に含む。

【0025】

別の実施形態において、個々の基準スペクトルは、(a)異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することが知られている対象の試料、(b)健常対照対象の試料、及び/又は(c)プローブと接触していない試料から決定される。一実施形態において、試料は、特定の病原性タンパク質凝集体を有する又は有さないことが知られている非血漿血液成分である。

10

【0026】

当技術分野において公知の種々の方法を使用してスペクトルアンミキシングを実施して、個々の基礎スペクトルの重み付けを決定することができる。例えば、一実施形態において、スペクトルアンミキシングは、線形代数的方法を使用して実施する。一実施形態において、スペクトルアンミキシングは、非線形代数的方法を使用して実施する。別の実施形態において、スペクトルアンミキシングは、Levenberg-Marquardtアルゴリズムを使用して実施する。

【0027】

当技術分野において公知の種々の方法を使用して蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを1つ又は複数の参照スペクトルと比較して、スペクトル間の対応を決定すること又はスペクトル間の差異又は類似性を決定することもできる。一実施形態において、好適な方法は、スペクトル間の類似性又は差異の定量的尺度を作成する。一実施形態において、本明細書中に記載した方法は、スペクトル又は1組のスペクトルが異常タンパク質凝集と関連する疾患の存在又は病原性タンパク質凝集体の存在を示す統計的尺度又は確率スコアを作成する工程を更に含む。例えば、一実施形態において、機械学習、遺伝的アルゴリズム又は主成分分析を、スペクトル又は1組のスペクトルの比較に使用できる。

20

【0028】

別の実施形態において、異常タンパク質凝集と関連する疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、軽度認知障害、脳アミロイド血管症、ミオパチー、ニューロパチー、脳外傷、前頭側頭型認知症、ピック病、多発性硬化症、プリオン病、ダウン症候群及びALSからなる群から選択される。

30

【0029】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体は、アミロイドタンパク質、場合により α -アミロイド、 β -シヌクレイン、ハンチンチン、タウタンパク質、過剰リン酸化タウタンパク質(pTau)、プリオンタンパク質、B-クリスタリン(CRYAB)、デスミン、セレン含有タンパク質、アクチン、ミオシン及び/又はスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を含む。

【0030】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体は β -アミロイドを含み、疾患はアルツハイマー病である。

40

【0031】

別の実施形態において、対象からの白血球を病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程は、アルカリ性pHで実施する。例えば、一実施形態において、pHは、9超、10超又は11超である。一実施形態において、pHは、場合により約10.5である。別の実施形態において、対象からの白血球を病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程は、酸性pH、場合によりpH6未満、5未満又は4未満で実施する。

【0032】

別の実施形態において、本明細書中に記載した方法は、複数の異なる励起波長を使用して複数の蛍光測定値又は複数の蛍光スペクトルを発生させる工程を含む。例えば、一実施

50

形態において、方法は、2つ以上の励起波長で2つ以上の蛍光発光スペクトルを発生させる工程を含む。一実施形態において、方法は、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個又は10個超の励起波長でそれぞれ3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個又は10個超の蛍光発光スペクトルを発生させる工程を含む。理論によって限定されるものではないが、励起波長の変更及び2つ以上の蛍光スペクトルの分析により、血液中の病原性タンパク質凝集体の検出のための本明細書中に記載した方法の感度及び/又は特異性が増大すると考えられる。

【0033】

別の実施形態において、励起波長の少なくとも1つは、近紫外にあり、場合により約200nm～約400nmである。一実施形態において、励起波長の少なくとも1つは、約300nm～約500nm、場合により約375nm又は約445nmである。別の実施形態において、励起波長は、固定半導体レーザーダイオードの標準波長に相当する。一実施形態において、励起波長は、約375nm、約405nm、約445nm及び約457nmから選択される1つ又は複数の波長を含む。一実施形態において、励起波長の少なくとも1つは、約200nm～2000nmである。

10

【0034】

別の実施形態において、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルは、複数の波長で蛍光の強度又は吸収を測定することによって発生させる。一実施形態において、スペクトルは、約400nm～約700nm又は約200nm～約2000nmの測定値を取ることによって発生させる。

【0035】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光又は吸収は、細胞数に対して正規化する。一実施形態において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光又は吸収は、蛍光又は吸収を測定する試料中の、例えば、光路内の又は撮像視野(imaging field)内の細胞数に対して正規化する。細胞数を決定するための当技術分野で公知の種々の方法は、DRAQ5等のフルオロフォアを使用して細胞核を染色すること等によって、試料中の細胞の数を定量化又は推定する工程を含む。

20

【0036】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程は、キュベット又はマイクロタイタープレート中で非血漿血液成分の試料中の病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光又は吸光度を測定する工程を含む。

【0037】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程は、非血漿血液成分の試料を含む二次元場の全て又は一部において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光又は吸光度を測定する工程を含む。

30

【0038】

本開示はまた、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する疑いがある対象に由来する非血漿血液成分を評価するための方法であって、

a)対象から被検血液試料を得る工程と、

b)被検血液試料から非血漿血液成分を単離する工程と、

c)非血漿血液成分を、非血漿血液成分中の病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程と、

40

d)病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程と

を含み、非血漿血液成分中の病原性タンパク質凝集体の存在が、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す、方法に関する。

【0039】

一実施形態において、非血漿血液成分は、白血球、微小胞及び/又は血小板である。一実施形態において、非血漿血液成分は、白血球又は血小板である。

【0040】

一実施形態において、プローブは、蛍光プローブ、場合により立体構造感受性プローブである。

【0041】

50

別の実施形態において、プローブは、コンゴレッド、コンゴレッド誘導体、K114、X34、BSB、FSB、IMSB、クリサミン-G、メトキシ-X34、メトキシ-X04、チオフラビンT、チオフラビンS、ピッツバーグ化合物B、チアジンレッドR、オーラミンO又はp-FTAA、p-FTAAに関連する発光性共役ポリチオフェン(LCP)若しくは発光性共役オリゴチオフェン(LCO)である。

【0042】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程は、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光又は吸光度を検出する工程を含む。

【0043】

別の実施形態において、蛍光又は吸光度を検出する工程は、本明細書中に記載した、蛍光シグナルの強度を検出する工程、蛍光発光スペクトルを発生させる工程又は吸収スペクトルを発生させる工程を含む。

10

【0044】

別の実施形態において、異常タンパク質凝集と関連する疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、軽度認知障害、脳アミロイド血管症、ミオパチー、ニューロパチー、脳外傷、前頭側頭型認知症、ピック病、多発性硬化症、プリオン病、ダウン症候群及びALSからなる群から選択される。

【0045】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体は、アミロイドタンパク質、場合により α -アミロイド、 β -シヌクレイン、ハンチンチン、タウタンパク質、過剰リン酸化タウタンパク質(pTau)、プリオンタンパク質、B-クリスタリン(CRYAB)、デスミン、セレン含有タンパク質、アクチン、ミオシン及び/又はスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を含む。

20

【0046】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体は α -アミロイドを含み、疾患はアルツハイマー病である。

【0047】

本開示はまた、異常タンパク質凝集と関連する疾患を検出するための、非血漿血液成分の分析用キットであって、

(a)非血漿血液成分中における病原性タンパク質凝集体の存在を検出するプローブと、

(b)使用説明書と

を含む、キットに関する。

30

【0048】

一実施形態において、プローブは、蛍光プローブ、場合によりコンゴレッド、コンゴレッド誘導体、K114、X34、BSB、FSB、IMSB、クリサミン-G、メトキシ-X34、メトキシ-X04、チオフラビンT、チオフラビンS、ピッツバーグ化合物B、チアジンレッドR、オーラミン-O若しくはp-FTAA又はp-FTAAに関連する発光性共役ポリチオフェン(LCP)若しくは発光性共役オリゴチオフェン(LCO)である。

【0049】

別の実施形態において、異常タンパク質凝集と関連する疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、軽度認知障害、脳アミロイド血管症、ミオパチー、ニューロパチー、脳外傷、前頭側頭型認知症、ピック病、多発性硬化症、プリオン病、ダウン症候群及びALSからなる群から選択される。

40

【0050】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体は、アミロイドタンパク質、場合により α -アミロイド、 β -シヌクレイン、ハンチンチン、タウタンパク質、過剰リン酸化タウタンパク質(pTau)、プリオンタンパク質、B-クリスタリン(CRYAB)、デスミン、セレン含有タンパク質、アクチン、ミオシン及び/又はSODを含む。

【0051】

一実施形態において、キットは、対象において異常タンパク質凝集と関連する疾患を検

50

出するのに有用である。別の実施形態において、キットは、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する疑いがある対象からの非血漿血液成分、例えば、白血球を評価するのに有用である。一実施形態において、キットは、例えば本明細書中に記載した方法を実施すること等によって、対象からの血液試料中の病原性タンパク質凝集体を検出するのに有用である。

【0052】

本開示の他の特徴及び利点は、下記の詳細な説明から明らかになるであろう。しかし、本開示の精神及び範囲内における種々の変更形態及び修正形態が当業者には種々の実施形態の説明から明らかになるので、説明及び具体例は、好適な実施形態を示すが単なる例示として提供するものであることを理解すべきである。

10

【0053】

実施形態を、図面との関連で、以下に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】5xFAD、ADトランスジェニックマウス脳に由来するホルマリン固定切片中の老人斑との結合時の蛍光アミロイドプローブ、X-34(Styrenら、2000年)の蛍光スペクトル画像及びスペクトルである。32チャンネルのスペクトル分解データが、各ピクセルから収集される。a)アミロイド斑の典型的な形態及び2つの斑「成熟」状態を示す、アンミキシング画像。b)数学的アンミキシング操作に使用された、斑及びレーザー後方散乱からの測定蛍光スペクトル。X-34画像中の大きなアミロイド斑コア及びエッジの間隔の狭い発光は、c

20

及びd)に示されるように、十分に分離されていた。これらの結果は、脳中のアミロイド斑を検出できるだけでなく、単一斑内の種々の凝集状態を区別できることを示している。

【図2】5xFADマウス脳に由来するホルマリン固定切片中の抗A (6E10)免疫蛍光を示す画像である。a)6E10免疫陽性である典型的な形態の老人斑(星印)。6E10陽性の血液細胞が、血管周辺でも観察される(正方形枠)。b)白血球がA である物質を含有することを示す、aの正方形枠の高倍率画像。

【図3】マウスバフィーコート試料における6E10免疫蛍光によるX-34の二重標識を示す画像及びスペクトルである。a~c)循環血液からの5xFADマウスバフィーコートにおける6E10免疫蛍光によるアンミキシングX-34画像。X-34陽性細胞は、6E10免疫蛍光シグナルと明らかに共局在化している。d)X-34陽性5xFADマウスバフィーコート白血球の蛍光スペクトル

30

。循環血液に由来するX-34陽性白血球の測定蛍光スペクトルは、5xFADマウス脳中の老人斑に由来するスペクトル(点線)と実質的に同一であり、これは、白血球が、斑中に見られるのと非常に類似した物質を含有することを実証している。

【図4】健常対照(HC)及びAD患者に由来するバフィーコート中のアミロイド様物質との結合時のX-34の二光子蛍光スペクトル画像、スペクトル及びグラフである。a)トゥルーカラー(左カラム)、アンミキシング自己蛍光(灰色)及びAD特異的X-34(白色)チャンネル(中央及び右カラム)。AD特異的X-34シグナルは、ADバフィーコートのみから検出された。b)AD特異的X-34シグナル及び自己蛍光の発光スペクトル。c)AD白血球においてのみ強力なAD特異的シグナルを示す棒グラフ。CJDは、クロイツフェルトヤコブ病を有する患者を指す。

【図5】健常対照(HC)及びAD患者に由来するバフィーコートにおける、アミロイドプローブX-34を抗A 抗体(6E10)と共に用いた二重標識を示す画像である。AD特異的X-34シグナル(詳細は図4を参照のこと)は、AD白血球においてのみで強力であり(f)、強力なA 免疫標識と共局在化している(g)。しかし、AD白血球の画分のみが陽性であった。これに対して、健常対照バフィーコートでは、非常に弱いバックグラウンドシグナルのみが見られる(b、c)。レーザー後方散乱は好都合なことに、各細胞(d、h)を識別し、このシグナルは、本明細書中に記載したスペクトル技術を使用して他の発光から完全に分離される。

40

【図6】健常対照(HC)及びAD患者に由来するバフィーコート中のアミロイド様物質との結合時の別の蛍光アミロイドプローブ、K114(Crystal、2003年)の蛍光スペクトル画像及びスペクトルである。a)トゥルーカラー(左カラム)、アンミキシング自己蛍光及びAD特異的X114チャンネル(右カラム)。b)HC特異的、AD特異的K114シグナル及び自己蛍光の発光スペ

50

クトル。

【図7】対象がAD又は軽度認知障害(MCI)のいずれかを有する確率を反映する簡易複合指数を示すグラフである(「ADR指数」、即ち、「AD関連指数」)。患者から得た白血球細胞をアミロイドプローブK114で標識し、上記のようにスペクトル分析した。

【図8】コンゴレッドで染色した、多発性硬化症患者に由来するヒト脳を示す図である。これらのデータは、慢性MS斑がアミロイドの沈着物を有することを示唆しており、これは、ADと類似した方法で血液白血球中において検出可能なはずである。

【図9】実施例6に記載するようにして、プローブK114を使用して、1月齢、2月齢、3月齢及び10月齢の、アルツハイマー病(5xFAD)のトランスジェニックマウスモデルに由来する血液試料(図9A)及び脳試料(図9B)並びに野生型(WT)対照に由来する試料のスペクトル分析によって得られたAD指数を示すグラフである。

10

【図10】実施例7に記載するようにして、アルツハイマー病(AD)と診断された対象に由来する血液を健常対照(HC)と比較して分析することによって得られたスペクトルである。

【図11】A₁₋₄₂に対する抗体及び病原性タンパク質凝集体のためのプローブ(K-114)による、健常対照(図11A)及びアルツハイマー病(AD)を有する対象(図11B)から得られた白血球の染色を示す図及びグラフである。健常対照及びAD対象はいずれも、A₁₋₄₂染色を示したが、図11Bは、はるかに高レベルのK-114染色を示し、これは、病原性タンパク質凝集体の存在を示している。白血球は典型的には、小さく明るい封入体及びより散在性の細胞質染色を示し、これらはいずれも、アミロイドプローブ標識に対して陽性である。封入体は健常対照及びAD血液の両方でみられるが、AD試料でより多く、特有のスペクトルシグネチャを示し；一方、細胞質標識は、AD試料でより強く、健常対照の白血球では実質的に検出不可能である。A₁₋₄₂は、白血球のサブセットを免疫標識し、顆粒及び散在性サイトゾルをいずれも標識する。図11Cは、A₁₋₄₂免疫標識の総強度が、AD対健常対照(HC)で同様であることを示している。

20

【図12】アルツハイマー病(AD)を有する対象及び健常対照(HC)から得られたスペクトルと比較した、病原性タンパク質凝集体と結合するプローブ(K-114)を用いて、外傷性脳損傷(TBI)の5日後の依然として昏睡状態にある対象に由来する白血球を分析することによって得られたスペクトルである。

【図13】野生型対照及び5xFADマウスから得られた血小板の、K-114による染色を示す、画像及びグラフである。図13A及び13Bは、K114トゥルーカラー画像を示し、図13C及び13Dは、アンミキシングK114画像を示す。図13Eは、A₁₋₄₂特異的K114シグナル及び自己蛍光の発光スペクトルを示す。5xFAD血小板は、野生型対照血小板と比較して高いA₁₋₄₂特異的K114シグナルを示す(図13B及び13D)。

30

【発明を実施するための形態】

【0055】

本発明者らは、AD対象に由来する非血漿血液成分におけるアミロイドプローブ蛍光のスペクトルシグネチャが、ヒト及びマウスの脳老人斑に由来するものと非常に類似することを発見した。したがって、非血漿血液成分は脳の斑において見られる物質と同様な物質を含有することが実証された。理論によって拘束されるものではないが、病原性タンパク質凝集体に曝露された非血漿血液成分、例えば、白血球、血小板及び/又は赤血球は、これらの凝集体を蓄積すると仮定される。本方法は、循環非血漿血液成分中の病原性タンパク質凝集体の存在を、異常タンパク質凝集と関連する疾患の診断に関連付ける。非血漿血液成分中の病原性タンパク質凝集体を検出及び/又は特定するための方法も記載する。

40

【0056】

したがって、本開示の一態様は、対象において異常タンパク質凝集と関連する疾患を検出する方法であって、対象の非血漿血液成分中の病原性タンパク質凝集体の存在が、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す、方法を提供する。本開示の別の態様は、対象に由来する血液試料中の病原性タンパク質凝集体を検出するための方法であって、試料を病原性タンパク質凝集体と結合するプローブと接触させる工程と、場合により、スペクトル分析によって試料中の病原性タンパク質凝集体の型又は組成を特定する

50

工程による方法を提供する。

【0057】

本明細書中で使用する用語「異常タンパク質凝集と関連する疾患」は、タンパク質のミスフォールディング及び凝集と関連する並びに/又はタンパク質のミスフォールディング及び凝集を特徴とするあらゆる疾患を指す。このような疾患において、タンパク質は、可溶性の機能状態から、高いシート含有量を有する高秩序の原線維集合体(「アミロイドペプチド」又は「アミロイド」)へとミスフォールド及び凝集し得る。「異常タンパク質凝集と関連する疾患」はその他の点では関連付けることができないが、それらは、アミロイドプロブ、例えば、コンゴレッドと共通の結合を有する。異常タンパク質凝集と関連する疾患としては、これらに限定するものではないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、軽度認知障害、脳アミロイド血管症、脳外傷、前頭側頭型認知症、ピック病、多発性硬化症、プリオン病、ダウン症候群及び筋萎縮性側索硬化症(ALS)が挙げられる。異常タンパク質凝集と関連する他の疾患としては、神経筋障害、例えば、ミオパチー(例えば、デスミノパチー(desminopathy)、 β -クリスタリノパチー(crystallinopathy)、セレノプロテインパチー(selenoproteinopathy)、遺伝性封入体ミオパチー、アクチノパチー(actinopathy)、ミオシノパチー(myosinopathy)(Vicartら1998年)及びニューロパチー、例えば、家族性アミロイドーシスニューロパチー(Sharma及びGoebel、2005年)が挙げられる。異常タンパク質凝集と関連する疾患としては、神経障害及び/又は神経変性障害も挙げられる。異常タンパク質凝集と関連する疾患は本明細書中に列挙した特定の疾患に限定されず、その病態の一部としてミスフォールドしたタンパク質凝集体を含むあらゆる疾患を、本明細書中に記載した方法を使用して検出し得る。

10

20

【0058】

異なる疾患では、異なるタンパク質がミスフォールドして凝集し得る。例えば、アルツハイマー病は、脳組織に蓄積する β -アミロイド含有斑を特徴とする。パーキンソン病では、 α -シヌクレイン(α -Syn)神経封入体が見られる。ハンチントン病は、ハンチンチンタンパク質の凝集と関連している。プリオン病、例えば、伝播性海綿状脳症、ウシ海綿状脳症及びクロイツフェルトヤコブ病(CJD)の原因である感染因子は、プリオンタンパク質のミスフォールドして凝集した変種である。更に、本発明者らは、アミロイド沈着物が多発性硬化症患者の脳で見られるという証拠を有する。

【0059】

本明細書中で使用する用語「病原性タンパク質凝集体」は、体内に存在するタンパク質及びポリペプチドの、毒性のある、ミスフォールドして凝集した変種を指す。本明細書中で使用する用語「タンパク質凝集体」は、ミスフォールドしたペプチド又はタンパク質オリゴマー、例えば、ペプチドダイマー及びダイマーより大きいオリゴマーを指す。「病原性タンパク質凝集体」の例としては、アミロイドが挙げられる。「アミロイド」は、不溶性線維性タンパク凝集体を記載するのに使用される一般用語である。病原性タンパク質凝集体は、可溶性凝集体、例えば、 β -アミロイドオリゴマーも含み得る。病原性タンパク質凝集体は、単一タンパク質又は複数の異なるタンパク質から構成され得る。病原性タンパク質凝集体は、脂質及び核酸成分も含み得る。病原性タンパク質凝集体中に見出し得るタンパク質の例としては、これらに限定するものではないが、 β -アミロイド、 α -シヌクレイン、ハンチンチン、タウタンパク質、過剰リン酸化タウタンパク質(pTau)、プリオンタンパク質、 β -クリスタリン(CRYAB)、デスミン、セレン含有タンパク質、アクチン及びミオシン並びにスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)が挙げられる。

30

40

【0060】

本明細書中で使用する表現「対象において異常タンパク質凝集と関連する疾患を検出する方法」は、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有するかどうかを判定する方法又はプロセスを指す。表現「対象において異常タンパク質凝集と関連する疾患を検出する方法」は、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を発現する、増大したリスクを有するかどうかを判定する方法も指す。本明細書中で使用する用語「リスク」及び「増大したリスク」は、対象が疾患を発現する素因を有すること、例えば、集団の平均リスクと比較

50

して増大したリスクを有することを指す。表現「疾患を検出する」は、発症前の患者において疾患を検出することも指す。「疾患を検出する」は、疾患のステージ、重症度、サブタイプ又は進行を検出することも含む。

【0061】

一実施形態において、本明細書中に記載した方法は、対象から血液試料を得る工程を含む。血液試料を得る方法は、当技術分野において周知である。一実施形態において、試料は、血液、全血又はその分画を含む。別の実施形態において、血液試料はパフィーコートを含む。更なる実施形態において、血液試料は白血球を含む。本明細書中で使用する「非血漿血液成分」は、血漿以外の血液の構成要素、例えば、赤血球、白血球、微小胞及び血小板を指す。

10

【0062】

パフィーコートは、血液の密度勾配遠心分離後の、抗凝固処理血液試料の分画である。パフィーコートは、血液の白血球及び血小板のほとんどを含有する。パフィーコートは、当技術分野で公知の任意の技術を用いて血液試料から単離することができる。場合により、血液試料を遠心分離してもよく、パフィーコート(又は白血球バンド)を除去してもよい。一実施形態において、赤血球を含まない試料が望ましい場合には、あらゆる夾雑赤血球を溶解させる。

【0063】

本明細書中で使用する用語「白血球(leukocyte)」又は「白血球(white blood cell)」は、免疫系の細胞を指す。白血球の例としては、顆粒球、例えば、好中球、好酸球及び好塩基球、リンパ球、単球並びにマクロファージ(単球の派生体)が挙げられる。一実施形態において、病原性タンパク質凝集体は、食作用性血液白血球、例えば、これらに限定するものではないが、単球及び/又はマクロファージにおいて確認される。理論によって拘束されるものではないが、主な型の白血球は全て、病原性A 又は他のミスフォールドしたタンパク質/ペプチドを蓄積して、次にこれらを循環血液に運搬する可能性があり得ると考えられている。マクロファージ及び好中球による食作用は、重要な一連の防御であり、病原体及び老廃物を除去する。更に、リンパ球は食作用性でないが、これらの免疫細胞間での細胞間タンパク質移動(トロゴサイトーシス)が観察されている(Caumartinら、2006年において概説されている)。

20

【0064】

本明細書中で使用する用語「白血球を単離する工程」は、白血球を含む、白血球からなる又は白血球から本質的になる試料を得る工程を指す。一実施形態において、白血球を単離する工程は、非白血球細胞を含まない又は実質的に含まない試料を得る工程を指す。用語「白血球を単離する工程」は、場合により、血液試料のパフィーコート層を単離する工程を指す。本明細書中に記載した方法は、白血球の試料、例えば、白血球を含む、白血球からなる又は白血球から本質的になる試料について実施する。別の実施形態において、本明細書中に記載した方法は、パフィーコート試料について実施する。

30

【0065】

別の実施形態において、特定の型の白血球細胞を単離し、本明細書中に記載した方法をその特定のサブタイプについて実施する。白血球細胞型の例としては、好中球、好酸球及び好塩基球、リンパ球、NK細胞、単球並びにマクロファージが挙げられる。

40

【0066】

図13に示されるように、病原性タンパク質凝集体と関連する血小板は、K114で染色された場合に特徴的なスペクトルを示し、健常対照に由来する血小板と差別化できる。他の非血漿血液成分、例えば、赤血球及び微小胞も、病原性A 又は他のミスフォールドしたタンパク質/ペプチドを蓄積し、次にこれらを循環血液に運搬し得る。

【0067】

本明細書中に記載した方法は、対象の非血漿血液成分中の病原性タンパク質凝集体の特定を含む。非血漿血液成分中の病原性タンパク質凝集体の存在は、多くの方法を使用して検出できる。一実施形態において、病原性タンパク質凝集体は、非血漿血液成分において

50

、特異的に病原性タンパク質凝集体と結合し且つ/又は病原性タンパク質凝集体と相互作用するプローブを使用して検出する。

【0068】

本明細書中に記載した方法は、対象の非血漿血液成分と関連する病原性タンパク質凝集体の特定を含む。非血漿血液成分と関連する病原性タンパク質凝集体の存在は、多くの方法を使用して検出できる。本明細書中で使用する、非血漿血液成分「と関連する」という用語は、非血漿血液成分の表面に吸着若しくは吸収される、非血漿血液成分の内部に吸収される又は非血漿血液成分外の分離顆粒中の、病原性タンパク質凝集体を指すのに使用する。一実施形態において、非血漿血液成分「と関連する」という用語は、白血球細胞表面に吸着若しくは吸収される、白血球内部に吸収される又は白血球外の分離顆粒中の、病原性タンパク質凝集体を指す。

10

【0069】

一実施形態において、病原性タンパク質凝集体は、非血漿血液成分、例えば、白血球において、特異的に病原性タンパク質凝集体と結合し且つ/又は病原性タンパク質凝集体と相互作用するプローブを使用して検出する。本明細書中で使用する用語「病原性タンパク質凝集体と結合するプローブ」は、凝集体との直接結合及び間接結合をいずれも含む。

【0070】

本明細書中で使用する用語「プローブ」は、病原性タンパク質凝集体と直接的に又は間接的に結合する検出可能なあらゆる作用物質を指す。一実施形態において、プローブは、蛍光プローブ又は発光プローブである。「蛍光プローブ」は、別の波長の光によって活性化された場合に特定波長の光を発することができるプローブである。

20

【0071】

別の実施形態において、プローブは、立体構造感受性の蛍光又は発光プローブである。「立体構造感受性」は、蛍光及び/又は発光プローブの吸収及び/又は発光スペクトル並びに発光強度が、標的ペプチド、タンパク質、脂質、核酸又はそれらの高分子集合体の立体構造に応じて変化し、それによってこのような集合体又は凝集体の立体構造状態を報告することを示す。プローブは、病原性凝集体の検出の感度及び特異性を最大にするように前記高分子凝集体の立体構造状態に応じて最大のスペクトル変化を示すように設計することができる。

【0072】

別の実施形態において、プローブは、アミロイド原線維と特異的に結合する。アミロイドペプチドの検出に有用な立体構造感受性蛍光プローブの具体例としては、これらに限定するものではないが、コンゴレッド、コンゴレッド誘導体及びビス-スチリルベンゼン(例えば、K114、X34、BSB、FSB、IMSB、クリサミン-G、メトキシ-X34、メトキシ-X04)、チオフラビン類似体(チオフラビン-T、チオフラビン-S、ピッツバーグ化合物B)、チアジンレッドR、オーラミン-O、五量体ホルミルチオフェン酢酸(p-FTAA)及び関連した発光共役ポリチオフェン(LCP)又は発光共役オリゴチオフェン(LCO)が挙げられる。本明細書中で使用する用語「細胞をプローブと接触させる」又は「細胞をプローブで標識する」は、プローブが細胞中の病原性タンパク質凝集体(即ち、細胞内タンパク質凝集体)又は細胞と関連するタンパク質凝集体を結合できるように細胞をプローブに曝露するあらゆる手段を指す。一実施形態において、細胞は、プローブと接触させる又はプローブで標識する前に透過処理する。非血漿血液成分、例えば、細胞を蛍光プローブで標識する方法は、当技術分野において周知である。例えば、白血球は、場合により固定し、乾燥させ、次いで蛍光プローブで染色する。pH、時間、濃度及びプローブ用のビヒクルは、プローブに特異的であり得る。一実施形態において、本発明者らは、プローブは、アルカリ性pH、例えば、pH10超又は約10.5で、非血漿血液成分と接触させるのが好ましいと判断した。これにより、本明細書中に記載した分光学的方法を用いる病原性タンパク質凝集体の検出に対する感度及び/又は特異性が改善される。

30

40

【0073】

非血漿血液成分を標識すると、種々の方法を使用して、タンパク質凝集体への蛍光プロ

50

ープの結合を検出することができる。一実施形態において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程は、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの蛍光を検出する工程を含む。プローブの蛍光を検出する工程は、当技術分野において公知の任意の方法によって実施し得る。

【0074】

別の実施形態において、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブを検出する工程は、病原性タンパク質凝集体と結合したプローブの吸光度を検出する工程を含む。プローブの「吸光度」は、プローブが任意の特定の波長で吸収する光量である。プローブの吸光度を検出する工程は、当技術分野において公知の任意の方法によって実施し得る。別の実施形態において、プローブの吸光度を検出する工程は、吸収スペクトルを発生させる工程を含む。

10

【0075】

一実施形態において、プローブの蛍光又は吸光度は、分光計を使用してスペクトル分解する。分光計は、場合によりイメージング又は非イメージング分光計である。別の実施形態において、広視野スペクトルカメラを使用して、プローブ発光を検出する。

【0076】

一実施形態において、蛍光又は吸光度は、蛍光分光法を使用して検出する。一実施形態において、二光子分光イメージングを使用する。例えば、二光子分光イメージングは、従来の狭帯域超高速レーザー(例えば、Chameleon、Coherent社)又は超広帯域フェムト秒レーザー(Octavius、Thorlabs社)及びスペクトルレーザー走査型顕微鏡、例えば、Nikon A1 RMPを用いて実施し得る。別の実施形態において、多光子分光イメージング又は一光子分光イメージングを使用する。全紫外、近紫外、可視及び近赤外を含む1つ又はいくつかの励起波長を使用して、蛍光プローブを励起させることができる。一実施形態において、励起波長は、約200nm～約2000nm、場合により約400nm～700nmである。画像は、種々のプログラム、例えば、プログラムImageTrak(<http://www.ucalgary.ca/styslab/imagetrak>)を使用して分析することができる。

20

【0077】

別の実施形態において、蛍光又は吸光度は、非イメージング分光計を使用して、例えば、キュベット、小試料ホルダー又はマルチウェルプレートから検出する。この場合、標識細胞を懸濁させ、1つ又は複数のレーザー線によって励起させ、発光を(非イメージング)分光計によって収集する。

30

【0078】

更に別の実施形態において、蛍光又は吸光度は、FACS分析計の場合のように単一セルスペクトル分析を使用して検出する。別の実施形態において、マイクロプレートリーダーを使用する。

【0079】

一実施形態において、プローブの蛍光を検出する工程は、プローブからの蛍光シグナルの強度を検出する工程を含む。別の実施形態において、プローブの蛍光を検出する工程は、プローブからタンパク質凝集体特異的蛍光の強度を検出する工程を含む。用語「タンパク質凝集体特異的蛍光」は、病原性タンパク質凝集体に特異的な、タンパク質凝集体と結合するプローブからの蛍光であって、バックグラウンド蛍光、自己蛍光又は正常状態のタンパク質に起因しないものを指す。

40

【0080】

別の実施形態において、プローブの吸光度を検出する工程は、プローブによる吸収の程度、強度又は量を検出する工程を含む。別の実施形態において、プローブの吸収を検出する工程は、プローブによるタンパク質凝集体特異的吸光度の強度、程度又は量を検出する工程を含む。用語「タンパク質凝集体特異的吸光度」は、病原性タンパク質凝集体に特異的な、タンパク質凝集体と結合するプローブによる吸光度であって、バックグラウンド吸収、自己吸収又は正常状態のタンパク質に起因しないものを指す。

【0081】

50

方法は場合により、プローブの蛍光又は吸光度を、参照非血漿血液成分と接触した参照プローブの蛍光又は吸光度と比較する工程を更に含む。好ましくは、参照プローブと、対象の非血漿血液成分と接触させるのに使用するプローブとは、同一プローブである。

【0082】

一実施形態において、参照非血漿血液成分又は対照非血漿血液成分は、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する参照対象に由来する非血漿血液成分である。別の実施形態において、参照非血漿血液成分又は対照非血漿血液成分は、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さない参照対象に由来する非血漿血液成分である。参照非血漿血液成分は場合により、対象の非血漿血液成分と同時に検査する。別の実施形態において、参照非血漿血液成分は、対象の非血漿血液成分とは異なる時間に検査する。場合により、参照スペクトルは、予め決定した又は標準化した対照スペクトルであって、特定の病原性タンパク質凝集体を含む非血漿血液成分又は病原性タンパク質凝集体と関連する疾患を有する対象に由来する非血漿血液成分を代表するものである。本明細書中で使用する用語「対象の非血漿血液成分」は、被検対象に由来する非血漿血液成分を指す。好ましい一実施形態において、非血漿血液成分は白血球である。

10

【0083】

対象の非血漿血液成分の蛍光又は吸光度と、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する参照対象に由来する参照非血漿血液成分の蛍光又は吸光度との対応又は類似性は、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す。対象の非血漿血液成分の蛍光又は吸光度と、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する参照対象に由来する参照非血漿血液成分の蛍光又は吸光度との差異は、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さないことを示す。

20

【0084】

同様に、対象の非血漿血液成分の蛍光又は吸光度と、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さない参照対象に由来する参照非血漿血液成分の蛍光又は吸光度との対応又は類似性は、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さないことを示す。

【0085】

対象の非血漿血液成分の蛍光又は吸光度と、参照非血漿血液成分の蛍光又は吸光度との対応又は類似性は場合により、蛍光の量、蛍光の強度若しくは蛍光の性質又は吸光度の程度によって決定する。別の実施形態において、対象の非血漿血液成分の蛍光又は吸光度と、参照非血漿血液成分の蛍光又は吸光度との対応又は類似性は、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを分析することによって、例えば、類似した蛍光発光スペクトル若しくは吸収スペクトルパターン又は蛍光発光スペクトル若しくは吸収スペクトルにおける類似のピーク及びトラフを特定することによって、決定する。

30

【0086】

別の実施形態において、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さない患者に由来する参照非血漿血液成分と比較した、対象の非血漿血液成分の蛍光又は吸光度の増加、場合により蛍光又は吸光度の統計的に有意な増加の確認は、被検対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す。

【0087】

別の実施形態において、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する患者に由来する参照非血漿血液成分と比較して同様な量の、対象の非血漿血液成分からの蛍光又は吸光度の確認は、被検対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す。一実施形態において、「同様な量」の蛍光又は吸光度は、蛍光又は吸光度に統計的な有意差がないことを指す。

40

【0088】

一実施形態において、蛍光の増加又は減少は、蛍光スペクトル画像を見ることによって、視覚的に決定できる。蛍光又は吸光度の増加は、定量化することもできる。一実施形態において、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さない患者に由来する参照非血漿血液成分と比較して、対象の非血漿血液成分からの蛍光又は吸光度の少なくとも10%、25%、50

50

%、75%又は100%の増加は、被検対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す。別の実施形態において、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する患者に由来する参照非血漿血液成分と比較して、対象の非血漿血液成分からの蛍光又は吸光度の少なくとも10%、25%、50%、75%又は100%の減少は、被検対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さないことを示す。

【0089】

また、蛍光又は吸収分光法の使用により、スペクトルシグネチャ又は蛍光発光スペクトル若しくは吸収スペクトルを、蛍光プローブで標識され非血漿血液成分から発生させる。蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルは、所与の試料に関して、プローブからの蛍光又は吸収シグナルの正規化された強度を波長に対してプロットする。それによって、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルは、所与の試料に特異的な蛍光又は吸収シグネチャを提供する。

10

【0090】

一実施形態において、本方法は、対象の非血漿血液成分の蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを、1種又は複数の参照非血漿血液成分の蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルと比較する工程を含む。

【0091】

対象の非血漿血液成分の蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルと、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する参照対象に由来する非血漿血液成分の参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルとの対応又は類似性は、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す。対象の非血漿血液成分の蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルと、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さない参照対象に由来する非血漿血液成分の参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルとの対応又は類似性は、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さないことを示す。本明細書中で使用するようにより、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトル間の対応又は類似性は、例えば、類似した蛍光発光スペクトル若しくは吸収スペクトルパターン又は蛍光発光スペクトル若しくは吸収スペクトルにおける類似のピーク若しくはトラフを特定することによって、決定する。一実施形態において、スペクトルシグネチャの少なくとも60、70、80、90又は95%がオーバーラップする又は実質的にオーバーラップする場合、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルは対応する。

20

30

【0092】

AD対象からの白血球アミロイドプローブ蛍光のスペクトルシグネチャは、ヒト及びマウスの脳老人斑に由来するものと同様であることが示された。したがって、別の実施形態において、参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルは、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する対象に由来する標識斑試料からの蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルである。場合により、斑試料は、ADを有する対象からのAD関連斑に由来する。被験試料の蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルが斑試料からの参照発光スペクトル又は参照吸収スペクトルに対応する又はそれと同様である場合、被検試料は病原性タンパク質凝集体を含み且つ/又は被検対象は異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する。

【0093】

40

別の実施形態において、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを分析して、疾患確率を示す指数を作成する。この場合、スペクトルを下記のようにして分析して種々の成分を抽出し、疾患確率を示す指数を指定する。特定の閾値を上回る、特異的な発光スペクトル又は吸収スペクトルからなるスコアは、被検細胞試料が病原性タンパク質凝集体を含み且つ/又は被検対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することを示す。

【0094】

一実施形態において、蛍光発光又は吸光度に基づく数値スコアを算出する。数値スコアは、被検細胞試料が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する患者に由来した確率を反映する。この場合、一光子共焦点スペクトル画像、二光子スペクトル画像又は多光子スペクトル画像を取得し、非血漿血液成分からの蛍光及び/又は吸光度シグナルを、アルゴリ

50

ズム(例えば、Levenberg-Marquardt減衰最小二乗法非線形曲線当てはめアルゴリズムに基づくアルゴリズム、又は線形代数アンミキシング/分解アルゴリズム)を使用して処理して、バックグラウンド及び自己蛍光発光から疾患特異的シグナルを分離する。定量的蛍光/吸光度データを抽出し、それによって疾患試料対非疾患試料の識別を可能にする。一実施形態において、数学的方法は、異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する対象に由来する試料と関連する数値スコア、及び異常タンパク質凝集と関連する疾患を有さない対象に由来する試料と関連する数値スコアを作成する。一実施形態において、疾患と関連する数値スコア又は疾患と関連しない数値スコアとの差異は、被検試料を疾患関連又は疾患非関連に分類できるほど十分に大きい。

【0095】

一実施形態において、本明細書中に記載した蛍光プローブと接触した非血漿血液成分から取得した蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルは、異なる種のスフォールドしたタンパク質、細胞自己蛍光及びバックグラウンドシグナルによって発生させた個々の基準スペクトルの線形複合スペクトルである。これらの基準スペクトルは、種々の強度を、寄与スペクトルの線形和である全複合スペクトルに提供する。アンミキシング操作は、全複合スペクトルへの各基準スペクトルの相対的寄与を定量的に算出するように設計する。基準スペクトルを標準試料(例えば、既知の健常対照、異常タンパク質凝集と関連する疾患、例えば、ADを有する既知の患者、非染色試料からの細胞自己蛍光)から決定したら、アルゴリズム、例えば、Levenberg-Marquardtアルゴリズムを使用して複合スペクトルをアンミキシングして、複合スペクトルに寄与した各基準スペクトルの重み付けを決定する。次いで、これらの重み付け係数を使用して、任意の1つの試料が健常対象又は罹患対象に由来した確率を示す種々の指数を算出する。

【0096】

したがって、一実施形態において、方法は、

- a. 対象の非血漿血液成分から蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを発生させる工程と、
 - b. スペクトルアンミキシングを実施して、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルに寄与する個々の基準スペクトルの重み付けを決定する工程と、
 - c. 重み付けを使用して、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する確率を決定する工程と
- を含む。

【0097】

本明細書中で使用する用語「スペクトルアンミキシング」は、個々の基準スペクトルを複合蛍光発光スペクトル又は複合吸収スペクトルから分離する任意の方法を指す。一実施形態において、スペクトルアンミキシングは、Levenberg-Marquardtアルゴリズムを使用して実施する。別の実施形態において、スペクトルアンミキシングは線形分解アルゴリズムを使用して実施する。

【0098】

一実施形態において、個々の基準スペクトルは、(a)異常タンパク質凝集と関連する疾患を有することが知られている対象の試料、(b)健常対照対象の試料、及び(c)プローブと接触していない試料から決定する。場合により、個々の基準スペクトルは、非血漿血液成分、例えば、白血球の試料から決定する。

【0099】

別の実施形態において、本明細書中に記載した方法は、機械学習、遺伝的アルゴリズム又は主成分分析を使用して、蛍光発光スペクトル又は吸収スペクトルを1つ又は複数の参照蛍光発光スペクトル又は参照吸収スペクトルと比較する工程を含む。例えば、一実施形態において、特定の疾患状態を有する対象に由来する非血漿血液成分を代表するスペクトルのデータセットを使用して遺伝的アルゴリズムを教育することによって、病原性タンパク質凝集体を結合するプローブと場合により接触した非血漿血液成分のスペクトルデータに基づいて対象の疾患状態を予測する。

10

20

30

40

50

【0100】

当業者ならば、上記方法を使用して、対象が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する確率を評価することができるであろう。

【0101】

別の実施形態において、非血漿血液成分、例えば、白血球の試料のスペクトル分析を異なる時点で実施して、沈着物の成熟度の差異を検出し、それによって基礎疾患のステージ、重症度又は進行速度を予測することができる。

【0102】

非血漿血液成分中の病原性タンパク質凝集体の存在はまた、病原性タンパク質凝集体に対する抗体を使用して検出することができる。一実施形態において、抗体は、抗 β -アミロイド抗体、例えば、6E10、4G8、AB5078P、12F4、AB9234又はOMABである。AB9234及びOMABは、 β -アミロイドオリゴマーと結合する抗体である。

10

【0103】

上記方法は、無傷の、場合により透過処理した細胞中の凝集体を検出することを企図し、別の実施形態においては、凝集体は、溶解した及び/又は冷凍した細胞において検出する。

【0104】

一実施形態において、方法は、異常タンパク質凝集と関連する疾患と関連することが知られている更なるタンパク質を検出する工程を更に含む。例えば、過剰リン酸化Tau、プリオンタンパク質、 β -クリスタリン及び α -シヌクレインを、場合により検出する。場合により、抗ホスホ-Tauを使用して過剰リン酸化Tauを検出し、6H4抗体を使用してプリオンタンパク質を検出する。また、ALSと関連する病原型のSODに対する抗体も使用し得る。

20

【0105】

本開示はまた、異常タンパク質凝集と関連する疾患を検出するために血液を分析するための、又は血液試料中の病原性タンパク質凝集体の存在若しくは型を検出若しくは特定するためのキットを提供する。

【0106】

一実施形態において、キットは、非血漿血液成分中の病原性タンパク質凝集体の存在を検出するプローブと、使用説明書とを含む。

30

【0107】

一実施形態において、使用説明書は、本明細書中に記載した方法のいずれかを実施する方法に関する指示を与える。

【0108】

プローブは、場合により、病原性タンパク質凝集体と結合する蛍光プローブである。別の実施形態において、プローブは、立体構造感受性蛍光プローブである。アミロイドペプチドの検出に有用な立体構造感受性蛍光プローブの具体例としては、これらに限定するものではないが、コンゴレッド、コンゴレッド誘導体及びビス-スチリルベンゼン(例えば、K114、X34、BSB、FSB、IMSB、クリサミン-G、メトキシ-X34、メトキシ-X04)、チオフラビン類似体(チオフラビン-T、チオフラビン-S、ピッツバーグ化合物B)、チアジンレッドR、オーラミン-O並びに五量体ホルミルチオフェン酢酸(p-FTAA)及び関連した発光共役ポリチオフェン(LCP)又は発光共役オリゴチオフェン(LCO)が挙げられる。

40

【0109】

他の実施形態において、プローブは、病原性タンパク質凝集体に対する抗体、例えば、抗 β -アミロイド抗体、例えば、6E10である。

【0110】

キットは、異常タンパク質凝集と関連する種々の疾患、例えば、これらに限定するものではないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、軽度認知障害、脳アミロイド血管症、ミオパチー、ニューロパチー、脳外傷、前頭側頭型認知症、ピック病、多発性硬化症、プリオン病、ダウン症候群及び筋萎縮性側索硬化症を検出するための血液

50

の分析に有用である。

【0111】

以下の非限定的な例は、本開示を例証するものである。

【実施例】

【0112】

(実施例1)

蛍光分光法を使用する血液からのアルツハイマー病の検出

多くの神経疾患、例えば、AD、パーキンソン病、ハンチントン病及びプリオン障害 (prionopathy) は、可溶性機能状態から高い β -シート含有量を有する高秩序の原線維集合体への、タンパク質のミスフォールディング及び凝集と関連する。これらの病理学的に無関係な障害は、古典的なアミロイドプローブ、コンゴレッドと共通の特異的な結合を有し、したがって、「コンゴレッド親和性」疾患と称する。アミロイド原線維を特異的に結合する立体構造感受性蛍光プローブは、タンパク質凝集の研究のために広範に使用されている (Styrenら、2000年; Klunkら、2002年; Mathisら、2002年; Aslundら、2009年; Nilssonら、2005年; Hammarstromら、2010年)。一部のより新しいプローブは、可溶性のオリゴマー種を検出し且つそれらが結合するタンパク質凝集体に応じてそれらの発光スペクトルを変える更なる特性を有し、微小な沈着物又は立体構造のわずかな変化を確認することができる。

10

【0113】

高度なスペクトルイメージングは、種々の型の凝集体と結合するアミロイドプローブからのわずかな変動を含むスペクトルの定量性の高い分離を可能にする。これらの技術を使用して、ADマウスモデルの脳及び血液からの (Oakleyら、2006年) 及びヒトAD患者からのミスフォールドしたタンパク質 (A β 又はその他) を検出するためのアッセイが考案された。プローブX-34 (コンゴレッド誘導体) によって標識されたタンパク質凝集体のスペクトルシグネチャを、CNS及び血液から研究した。

20

【0114】

X-34で標識したADトランスジェニックマウス脳の斑から強力の特異的なシグナルが得られ、単一老人斑内の「成熟度」及び凝集の種々の状態を区別することができた (図1)。このストラテジーを、ヒトAD患者の脳に対しても適用した。この場合、アミロイド斑は、パラフィン包埋切片において神経原線維変化及び自己蛍光リポフスチンと区別可能であった。-アミロイドシグネチャは、ADマウスの脳からのものと非常に類似していた。総合すると、これらの結果は、この方法が、タンパク質ミスフォールディング/凝集の、高感度で潜在的にAD特異的な検出を行えることを示している。

30

【0115】

抗A β 抗体6E10によるADトランスジェニックマウス脳の免疫染色は、典型的な形態を有する老人斑が6E10免疫陽性であることを示した (図2a)。更に、6E10陽性血液細胞が、血管周辺でも観察された (図2a及び図2b)。これは、斑中に見られるのと非常に類似した物質を細胞が取り込んだことを示している。理論によって拘束されるものではないが、循環白血球は、「センチネル」として作用し、ミスフォールドしたタンパク質を、罹患脳を通して輸送後のそれらの経験の「記憶」として運ぶ能力を有すると考えられる。

40

【0116】

死後脳の分析は、AD診断のためのデファクトスタンダードであるが、非常に実現困難である。したがって、非侵襲的技術を探し求めた。白血球が「循環センチネル」として作用するという仮説を裏付けるものとして、ADマウスの血液に由来するこのような細胞の多くはX-34に対して強陽性であり、スペクトルシグネチャは脳の斑に由来するものと非常に類似していた。これは、血液中の類似した「AD様病態」を検出することが可能であることを示唆している (図3d)。これらの陽性白血球の多くは、A β に対しても免疫陽性であった (図3a~図3c)。これは、これらの白血球がAD脳中に輸送され、且つ/又はこれらの白血球中の、取り込まれてから排出された、ミスフォールドした形態のA β が、脳血管系を通過して体循環に至ったという考えを裏付けている。野生型 (同腹子対照) 白血球からのプローブシ

50

グナルは、無視できる程度であった。

【0117】

次に、この方法を、ヒトAD血液試料で試験した。臨床的に診断されたAD患者及び対照(健常、脳卒中、クロイツフェルトヤコブ病(CJD))患者から新たに単離したバフィーコートについて、同様な分析を行った。AD試料は全て、X-34により強陽性の細胞を示し、これらは、全ての対照には実質的に存在しない特徴的な発光スペクトルを示す(図4a~図4b)。強いAD特異的な蛍光シグナルは、AD白血球においてのみ見られる(図4c)。これらの結果はまた、CJDタンパク質凝集体は、この分析に使用された(ADの検出のために特異的に選択された)基準スペクトルを有するプローブX-34を使用しても検出できないことを示し、CJDと関連する特有の推定上のミスフォールドしたタンパク質の検出には、CJDにとっては特有であるがADにとっては特有でない、異なる蛍光プローブ及び/又は異なる特異的発光スペクトルの検出が必要であろうことを示している。最後に、X-34陽性白血球は全て、抗A(図5)で共標識された(図5)。これは、ADマウスの場合と同様に、循環ヒト血液白血球において「AD様病態」の検出が可能なことを示している。

10

【0118】

総合すれば、これらの観察は、循環白血球においてAD病態の検出が可能なことを示している。このような末梢の異常は、AD脳における関連した病態を反映し、したがってADに対する信頼性が高い検査を構成する。

【0119】

(実施例2)

20

プローブK114を使用する白血球中のタンパク質凝集体の検出

アミロイド特異的染料であってコンゴレッドの類似体である蛍光プローブK114を使用して、ヒト白血球中のタンパク質凝集体を検出した。加えて、標識した白血球からの蛍光シグナルを、アルゴリズム(例えば、Levenberg-Marquardt減衰最小二乗法非線形曲線当てはめアルゴリズムに基づくアルゴリズム)を使用して処理して、バックグラウンド及び自己蛍光発光から疾患特異的シグナルを分離した。被検細胞試料が異常タンパク質凝集と関連する疾患を有する患者に由来した確率を反映する、蛍光発光に基づく数値スコアを、算出した。

【0120】

プロトコール

30

血液を患者から採取してEDTAチューブに入れ、氷上に置いた。標準技術を使用して、バフィーコート(白血球)を単離した。簡潔に言うと、血液試料を、室温において1,700RCFで遠心分離し、濃縮白血球バンド(中間の白色層)を取り出した。夾雑赤血球を、室温においてACK溶解用緩衝液によって3~5分間溶解させ、白血球試料をPBSで洗浄した。

【0121】

白血球を、10%中和緩衝ホルマリン中で固定した。固定された白血球の小アリコートをし、スライドガラスに載せ、乾燥させた。乾燥試料を、蛍光プローブK114又はX-34で染色した。

【0122】

プローブを緩衝液で洗浄し、水性封入剤をカバースリップし、レーザー走査顕微鏡上で画像化した。

40

【0123】

画像化は、連続波レーザー照明(共焦点検出を用いる一光子励起)又は種々の及び複数の波長の両方での二光子励起のいずれかを使用して実施した。場合により、多光子励起も使用し得る。

【0124】

数百個の細胞それぞれのいくつかの画像を、32チャンネルのスペクトル分解データを400~750nm(典型的な)にわたって取得する分光イメージングシステムを使用して取得した。

【0125】

細胞の画像を、蛍光封入体(対照試料及びAD/MCI(軽度認知障害)試料の両方に存在する)

50

及び白血球細胞質の蛍光増加について分析した。これらの封入体を大きさで分類し、明瞭な蛍光スペクトルを初期段階として手動で抽出した。これらの「基準スペクトル」は、試料中の種々の発光体:自己蛍光、レーザー後方散乱アーチファクト、各蛍光プローブからのいくつかの異なった発光に相当する。これらのスペクトルは、励起波長により異なり、各波長について再決定した(典型的には、2つの異なる励起波長を使用した)。

【0126】

これらの基準スペクトルを使用して、合成画像中の複合蛍光を処理して、各試料について各基準スペクトルの相対的重み付け/寄与を決定して、各基準スペクトルの数係数を得た。ソフトウェアは、Levenberg-Marquardt減衰最小二乗法非線形曲線当てはめアルゴリズムに部分的に基づくものであった。

10

【0127】

係数の比を使用して、各カテゴリー:対照、MCI(軽度認知障害)、AD、他の神経障害の「疾患指数」をコンピューターで算出した。特有の推定上のミスフォールドしたタンパク質を検出するために、異なる障害、例えば、CJD、BSEには、異なる蛍光プローブ及び/又は異なる基準スペクトルが必要である。

【0128】

結果

AD特異的シグナルが、K114で標識したAD患者からの白血球で観察された(図6a)。K114で標識した健常細胞の発光スペクトルは、K114で標識したAD細胞と区別可能であった(図6b)。

20

【0129】

図7は、対象がAD又は軽度認知障害(MCI)のいずれかを有する確率を反映する簡易複合指数である(「ADR指数」、即ち、「AD関連指数」。健常な対照(健常対照)、AD/MCIのない脳卒中患者(脳卒中)、「他の神経障害」を有する患者(OND)並びにアルツハイマー病(AD)、軽度認知障害(MCI)及び脳アミロイド血管症(CAA)を有する患者から、白血球を採取した。OND患者は、CJDを有していた。

【0130】

非ADR対照(健常対照、脳卒中及びCJD)は全て陰性であったが、ADR患者(AD+MCI)は全て陽性であった。加えて、脳アミロイド血管症(CAA)患者の4人に3人は陽性であった。このデータは、この方法がアルツハイマー病及び関連障害を有する患者を明らかに特定することを示している。

30

【0131】

(実施例3)

MS患者の脳におけるアミロイドの存在

ADは二次性の自然炎症による神経変性障害であると一般的に考えられているが、多発性硬化症(MS)に関する考え方は不明である。最初は、結果として起こる炎症性の攻撃が脱髄及び皮質萎縮を促進する一次性的自己免疫障害を支持する証拠が強力であった。しかし、詳細な病理学的検討からの最近のデータ及び強力な抗炎症治療法の経験は、この結論に疑問を投げかけた(Stysら、2012年)。

【0132】

したがって、MSが、異常に顕著な炎症を二次応答として有する一次性的変性障害でもあり得る可能性が存在する。その場合、MSの根底にあるものは何か? 後期慢性MSの病態(炎症性反応がそれほど顕著でない)は、脱髄性病変が時間とともに拡大する(斑内で離散性病巣から広がる可能性がある?)ことを示し、顕著な脳室周囲及び皮質の病態は、何らかの可溶性因子(CSF中を循環する可能性がある?)が原因であり得ることを示唆している。アミロイドは広がって更なるタンパク質をミスフォールドし、毒性可溶性種として循環し(例えば、ADにおけるAオリゴマー)、その後凝集して不溶性凝集体となることから、アミロイドはこの特性を有する。図8は、アミロイドプローブであるコンゴレッドで染色されたヒトMS脳を示す。これらのデータは、慢性MS斑がアミロイドの沈着物を有することを示唆している。これらの沈着物は、MSの主な特徴であり得、A がADにおいて行うと考えられるミ

40

50

エリン及び神経損傷を引き起こし、又は炎症の慢性発作に反応性であり得る。それとは関係なく、MS脳におけるアミロイド斑の存在は、ADと同様に、MS患者の循環白血球が、検出可能なアミロイド凝集体を運搬する可能性もあることを示している。

【0133】

(実施例4)

より大規模な研究: 蛍光分光法を使用するADの血液検査

AD30名及び年齢適合健常対照30名並びに他の非AD神経変性障害からの血液試料を入手する。パフィーコート単離し、白血球を立体構造感受性プローブで標識する。二光子スペクトル画像及び一光子スペクトル画像を取得し、白血球からの蛍光シグナルを、アルゴリズムを使用して処理して、AD特異的な発光をバックグラウンド発光及び自己蛍光発光から分離する。AD対象からの白血球アミロイドプローブ蛍光のスペクトルシグネチャは、ヒト及びマウスの老人斑からのものと実質的に同一であり、これは、特定の白血球サブセット(1~2%)が脳の斑に見られるのと同様な物質を含有することを強く示唆している。更に、これらのプローブ陽性白血球は抗A抗体で強力に共標識され、これは、脳(微小血管系及び/又は実質)を通して輸送された特定の白血球がAの豊富な環境に曝露され、本方法によって検出可能なこの曝露の「記憶」をもたらしたという理解と一致する。次いで、試料がAD患者に由来した確率を反映する、種々の蛍光発光に基づく数値スコアを算出する。選ばれた対象において、診断をはっきりと確定するために、死後の神経病理学的検査を行う。

【0134】

スペクトルシグネチャが異なっても、例えば感染症による、白血球の「活性化」がプローブ蛍光も増加させるという証拠がある。したがって、種々の感染症、自己免疫疾患及びリンパ増殖性障害(白血病、リンパ腫)を有するヒト対象も、本方法の特異性を確実にするために含める。

【0135】

技術を大幅に単純化し且つ比較的安価でハイスループットな機器の将来の開発への道を開く、一光子蛍光励起(共焦点)を使用できる証拠もある。

【0136】

(実施例5)

蛍光分光法を用いるウシ海綿状脳症(BSE)の血液検査

スクレイピー感染マウス及び健常マウスからの血液を使用して、赤血球(RBC)を、浸透圧ショックによって除去し、非RBC血液成分を分離した。細胞を、立体構造感受性アミロイドプローブで染色した。強陽性シグナルはスクレイピー血液成分でのみ見られ、非感染性マウスではシグナルは見られなかった。その上、スクレイピー感染血液試料からのスペクトルシグネチャは、プロテイナーゼK耐性、抗PrP陽性領域のスクレイピー脾臓と同一であった。

【0137】

次に、この方法を、実験BSE試料で試験した。健常な牛及び他の疾患(例えば、ポリオ、脳膿瘍)を有するものと共に、神経病理学的に証明されたBSE及び非BSE対照からの凍結単離パフィーコートについて、2つの異なる立体構造感受性アミロイドプローブを使用して同様な分析を行った。BSE試料はいずれも強陽性であり、他の試料(健常対照と感染非BSEウシの両方)は全て、明らかに陰性であった。このデータは、本明細書中に記載した蛍光スペクトル法は、BSEを罹患している動物にのみ存在する血液中のマーカートを、信頼性をもって検出できることを示している。

【0138】

(実施例6)

アルツハイマー病を有するトランスジェニックマウスからの血液及び脳切片の蛍光スペクトル分析

研究は、ADトランスジェニックマウス株(5XFAD、Oakleyら、2006年)について、本明細書中に記載した蛍光スペクトル法を使用して得られたADの血液シグネチャを脳AD病態と比

10

20

30

40

50

較して実施した。このアプローチの利点は、ヒト対象の場合と異なり、あらゆる所与の年齢でアミロイド脳病態の程度を正確に知ることが可能であることである。

【0139】

K-114で染色され且つ分光共焦点顕微鏡上で画像化された白血球からの蛍光スペクトルを選択することによって、マウス血液からAD指数を算出した。使用した励起波長は375、405、445及び457nmを含むが、これらの値の中間の波長を含むがこれらに限定されない他の波長も使用できる。AD及び健常な年齢適合野生型マウスを使用した。次に、これらのスペクトルを使用して、多くの細胞/画像からの凝集体スペクトルが正常スペクトルに比べて罹患スペクトルにどの程度密に近いかを示す係数を算出した。次いで、AD成分を表す係数に平均ピクセル強度を乗じて、血液のAD指数を得た。

10

【0140】

マウス脳切片をホルマリン固定し、K-114で染色した。これらの切片の代表的なスペクトル画像を取得し、脳領域を、蛍光強度閾値に基づいて選択した。次に、選択されたピクセルを集め(二次元画像のピクセルを合計し、強度対波長からなる単一のスペクトルベクトルに分解し)、上記血液に関するAD及び対照スペクトルを使用して処理した。得られた係数に平均ピクセル強度を乗じて、脳のAD指数を得た。

【0141】

結果を、図9に示す。既に発表されたように(Oakleyら、2006年)、AD斑の病態は約2カ月で始まり、月齢と共に急激に増加する。本明細書中に記載した蛍光スペクトルアッセイを使用すると、同一対象からの血液は、脳病態の最も早い開始と同じ月齢の2カ月において陽性となる。野生型(WT)の脳及び血液は、陰性のままである。このことは、本明細書中に記載した方法の感度が、血液において極めて早期の疾患を検出できることを更に裏付ける。

20

【0142】

(実施例7)

K-114を使用する、ヒト対象からの血液及び脳脊髄液の蛍光スペクトル分析

アルツハイマー病(AD)研究におけるヒト対象の使用は、死前のヒト試料から疾患の診断又はステージを確信するのは困難であるという事実によって複雑化される。本明細書中に記載した蛍光スペクトル法がヒト対象において他の検出法と一致するかどうかを検討するために、脳脊髄液(CSF)試料と並列して血液試料を検査し且つ現在認められている臨床的基準を使用してCSFを分析して(Athena Diagnostics ADmark(登録商標)Phospho-Tau/Total-Tau/A 42 CSFアッセイを使用してA (1-42)及びタウ/ホスホ-タウのCSFレベルを検査して)、対象候補がADを有するかどうかを判定することによって、検討を行った。

30

【0143】

A (1-42)及びタウ/ホスホ-タウのCSFレベルを検出することによってADを有すると陽性に確認された対象に由来する試料並びに健常対照に由来する試料からの、K-114で染色された白血球のスメアから、二次元共焦点スペクトル画像を得た。AD及びHC試料から、K-114発光をシグナル強度に基づいて単離し、積分し、スペクトル抽出した。いかなるK-114発光を示さなかった細胞領域をマスクして、バックグラウンドノイズを除いた。各試料に関する正規化スペクトルを、図10に示す。ADを有する対象から得た蛍光スペクトルは、健常対照と容易に区別され、短波長の方へ著しく青色シフトしている。

40

【0144】

(実施例8)

アルツハイマー病を有する対象及び健常対照からの末梢白血球試料中のA (1-42)及び病原性タンパク質凝集体の検出

アルツハイマー病を有する対象及び健常対照からの末梢白血球の試料を、緑色蛍光シグナルをもたらす、A (1-42)に対する検出可能な抗体(Millipore AB5078P)を使用して染色し、赤色蛍光シグナルをもたらす、病原性タンパク質凝集体と結合するプローブ(K114)でも染色した。

【0145】

50

図11に示すように、健常対照(図11A)とAD試料(図11B)はいずれも、白血球でA 1-42免疫染色を示す。両試料における平均蛍光染色強度は、概ね等しかった(図11C)。しかし、図11Bは、はるかに高い赤色強度を示す。これは、抗体と共に共染色された立体構造選択性アミロイドプローブからのAD特異的スペクトル発光に相当し、病原性タンパク質凝集体の存在を示している。対照試料ではAD特異的赤色シグナルはほとんどない。これは、末梢白血球におけるA 1-42の単純な免疫検出単独では、信頼性をもって健常対照とADとを区別できないという観察を強調している。病原性タンパク質凝集体を選択的に結合する蛍光プローブで染色された白血球からのスペクトルの形状の分析は、特定の波長における蛍光強度の単純な分析と比較して、著しく多い情報を提供し、正常対象とADを有する対象との区別を容易にする。同様に、複数の波長におけるスペクトルの分析及び比較は、異常タンパク質凝集と関連する他の疾患の検出を容易にすると予想される。

10

【0146】

(実施例9)

外傷性脳損傷を有する対象からの血液の蛍光スペクトル分析

外傷性脳損傷(TBI)はADに対する主要なリスク因子であり、研究により、アミロイド斑沈着は損傷直後に著しい可能性があることが示されている。ここで、本発明者らは、脳における生化学的アミロイド負荷量を推定する手段として脳損傷直後の病原性タンパク質凝集体を検出するために、ADの疑いがある対象からの血液のアッセイに使用した同様なアプローチを、TBIを有する対象からの血液のアッセイに適用しようと努めた。

【0147】

20

損傷5日後の対象が依然として昏睡状態にある間に、重症閉鎖性頭部損傷及びTBIを負った雄対象から、血液試料を得た。

【0148】

図12は、損傷5日後におけるTBIを有する対象からの白血球試料のスペクトル分析結果を、健常対照及びアルツハイマー病を有する対象から得たスペクトルと共に示す。処理して、プローブとしてK-114を使用して染色した血液白血球から、スペクトルを得た。実施例7に述べたようにして、二次元画像化を実施した。スペクトルは全て、375nmの励起波長を使用して得た。図12に示すように、TBIを有する対象からのスペクトルは、他と比べて赤色シフトしているように見え、明らかに正常範囲外である。

【0149】

30

本開示は、現在好ましい実施例であると考えられるものに関して記載したが、開示は、開示した実施例に限定するものではないことを理解すべきである。それとは反対に、開示は、添付した特許請求の範囲の精神及び範囲に含まれる種々の修正形態及び均等な構成を包含するものとする。

【0150】

本明細書中で確認される全ての出版物、特許及び特許出願は、個々の出版物、特許又は特許出願が参照によって全体として組み込まれることが具体的且つ個別に示されるかのように、参照によって全体として本明細書中に組み込む。

(参考文献)

1. Barnes, D. E. & Yaffe, K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol* **10**, 819-828 (2011).
2. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-766 (2001).
3. Britschgi, M. & Wyss-Coray, T. Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol* **82**, 205-233 (2007).
4. de la Torre, J. C. Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke* **33**, 1152-1162 (2002). 10
5. Deane, R. & Zlokovic, B. V. Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **4**, 191-197 (2007).
6. Nagababu, E., Usatyuk, P. V., Erika, D., Natarajan, V. & Rifkind, J. M. Vascular endothelial barrier dysfunction mediated by amyloid-beta proteins. *J Alzheimers Dis* **17**, 845-854 (2009).
7. Farkas, I. G. et al. Beta-amyloid peptide-induced blood-brain barrier disruption facilitates T-cell entry into the rat brain. *Acta Histochem* **105**, 115-125 (2003). 20
8. Majumdar, A. et al. Degradation of fibrillar forms of Alzheimer's amyloid betapeptide by macrophages. *Neurobiol Aging* **29**, 707-715 (2008).
9. Mildner, A. et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* **10**, 1544-1553 (2007).
10. Simard, A. R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J. P. & Rivest, S. Bone marrowderived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* **49**, 489-502 (2006). 30
11. Stamatovic, S. M. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of bloodbrain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 593-606 (2005).
12. McKhann, G. M. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 263-269 (2011).
13. Styren, S. D., Hamilton, R. L., Styren, G. C. & Klunk, W. E. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. *J Histochem Cytochem* **48**, 1223-1232 (2000). 40

14. Klunk, W. E. et al. Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 797-805 (2002).
15. Mathis, C. A. et al. A lipophilic thioflavin-T derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain. *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 295-298 (2002).
16. Aslund, A. et al. Novel pentameric thiophene derivatives for in vitro and in vivo optical imaging of a plethora of protein aggregates in cerebral amyloidoses. *ACS Chem Biol* **4**, 673-684 (2009). 10
17. Nilsson, K. P., Herland, A., Hammarstrom, P. & Inganas, O. Conjugated polyelectrolytes: conformation-sensitive optical probes for detection of amyloid fibril formation. *Biochemistry* **44**, 3718-3724 (2005).
18. Hammarstrom, P. et al. A fluorescent pentameric thiophene derivative detects in vitro-formed prefibrillar protein aggregates. *Biochemistry* **49**, 6838-6845 (2010). 20
19. Oakley, H. et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* **26**, 10129-10140 (2006).
20. Caumartin, J., Lemaoult, J. & Carosella, E. D. Intercellular exchanges of membrane patches (trogocytosis) highlight the next level of immune plasticity. *Transpl Immunol* **17**, 20-22 (2006).
21. Thambisetty, M. & Lovestone, S. Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark Med* **4**, 65-79 (2010). 30
22. van Rossum, I. A. et al. Injury markers predict time to dementia in subjects with MCI and amyloid pathology. *Neurology* (2012).
23. Senanarong, V. et al. Alzheimer's disease dementia as the diagnosis best supported by the cerebrospinal fluid biomarkers: difference in cut-off levels from thai experience. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, 212063 (2012).
24. Jack, C. R. J. Alzheimer disease: new concepts on its neurobiology and the clinical role imaging will play. *Radiology* **263**, 344-361 (2012).
25. Matsuda, H. & Imabayashi, E. Molecular neuroimaging in Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am* **22**, 57-65, viii (2012). 40

26. Nordstedt, C. et al. Human neutrophil phagocytic granules contain a truncated soluble form of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* **269**, 9805-9810 (1994).

27. Styren, S. D. et al. X-34, A Fluorescent Derivative of Congo Red: A Novel Histochemical Stain for Alzheimer's Disease Pathology. *J Histochem Cytochem* September 2000 vol. 48 no. 9 1223-1232

28. Crystal, A.S. et al. A comparison of amyloid fibrillogenesis using the novel fluorescent compound K114. *J Neurochem.* 2003 Sep;86(6):1359-68.

10

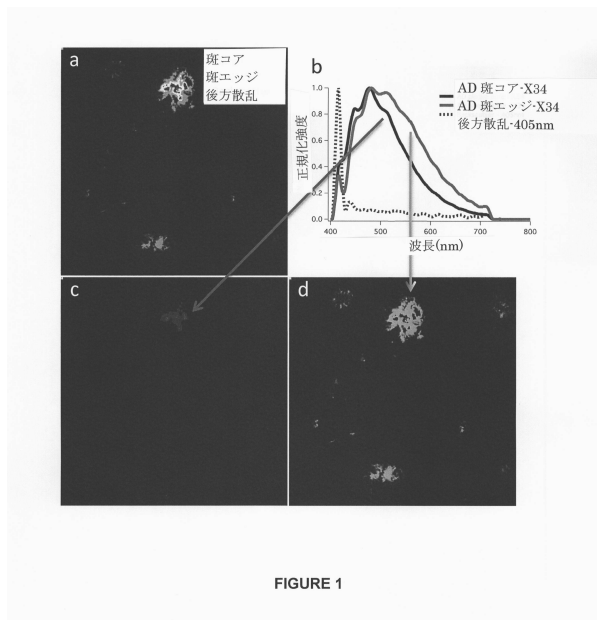
29. Vicart, P. et al. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature Genetics* **20**, 92 - 95 (1998)

30. Sharma MC, Goebel HH. Protein aggregate myopathies. *Neurol India.* 2005 Sep;53(3):273-9.

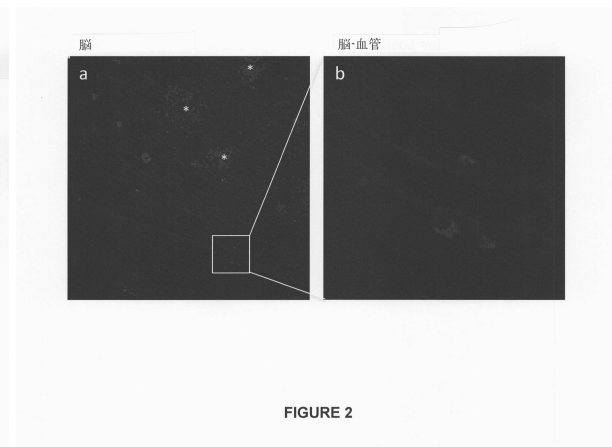
31. Stys PK, et al. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci.* 2012 Jul; 13(7):507-14.

20

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

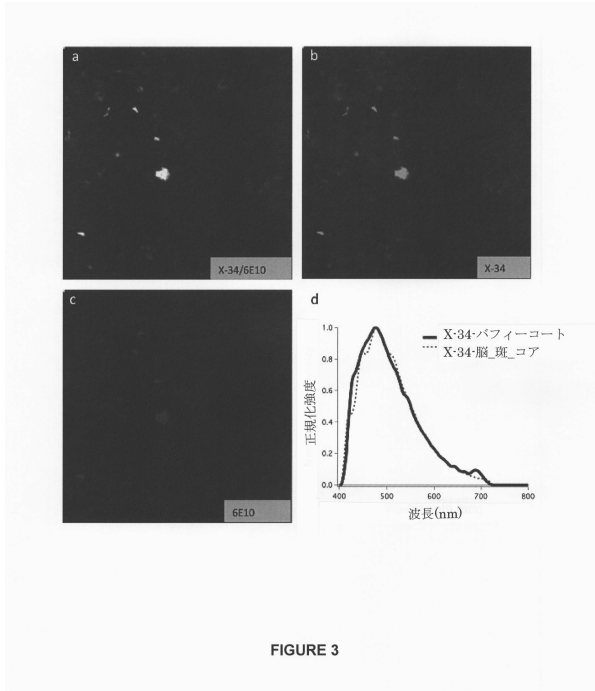


FIGURE 3

【 図 4 】

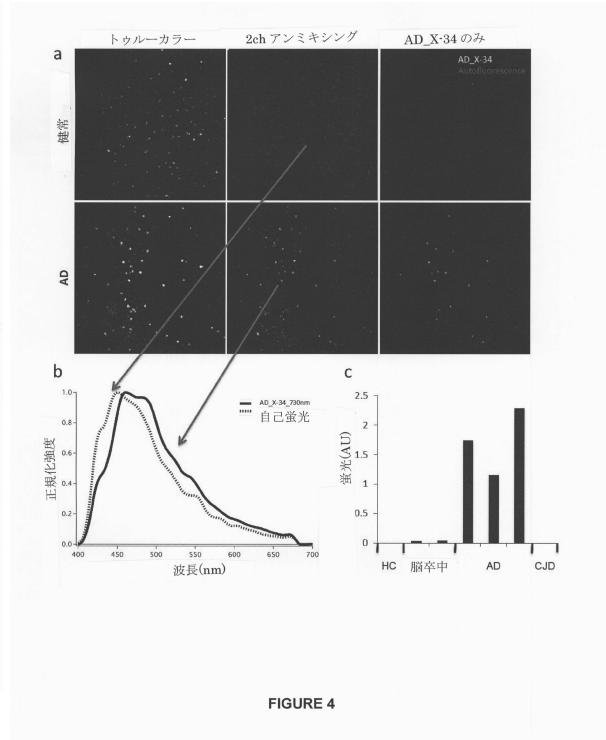


FIGURE 4

【 図 5 】

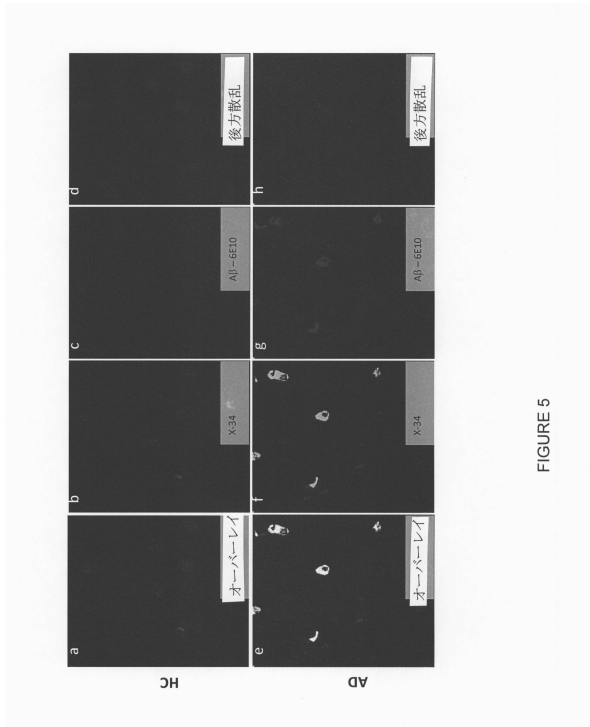


FIGURE 5

【 図 6 】

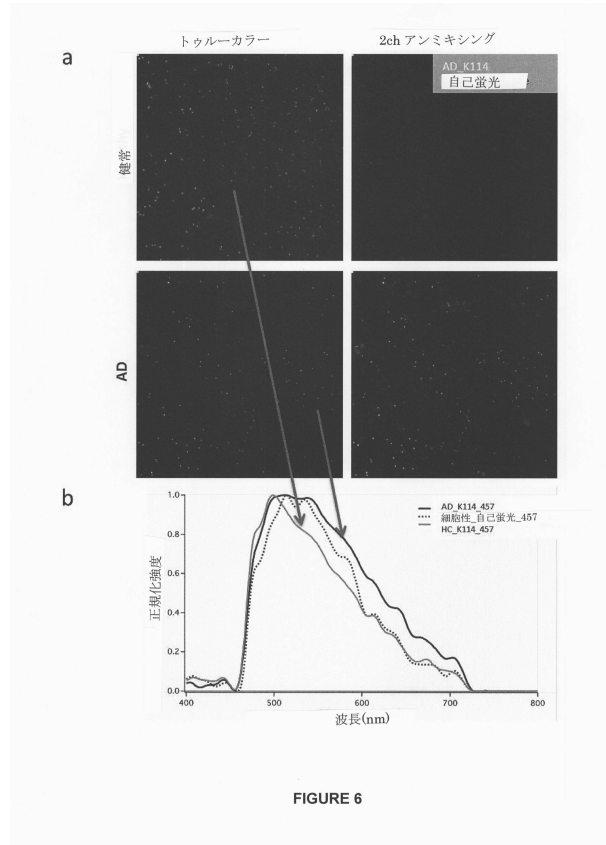


FIGURE 6

【 図 7 】

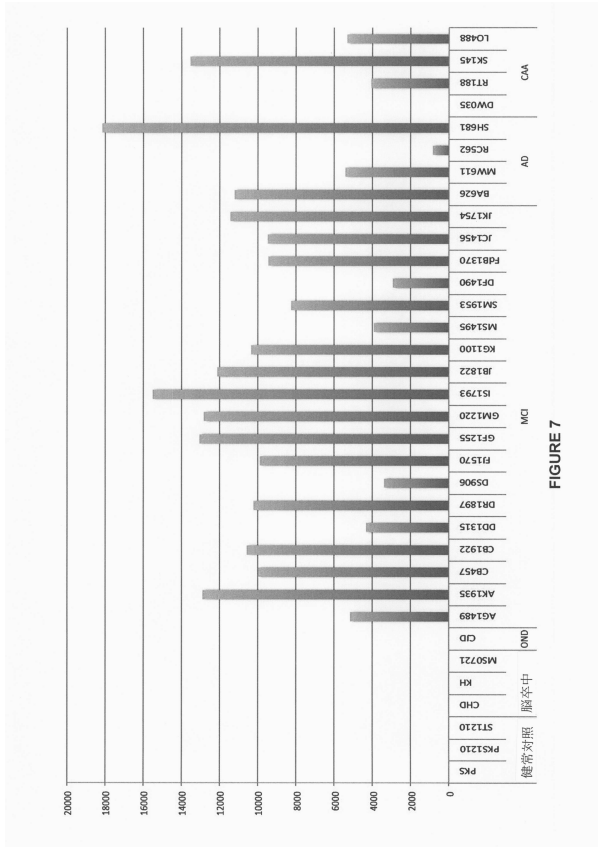


FIGURE 7

【 図 8 】

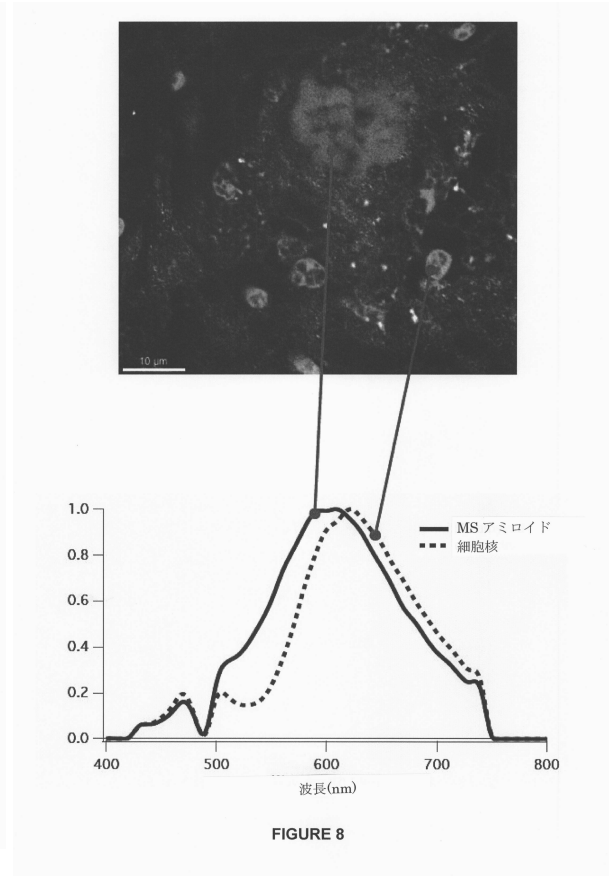


FIGURE 8

【 図 9 】

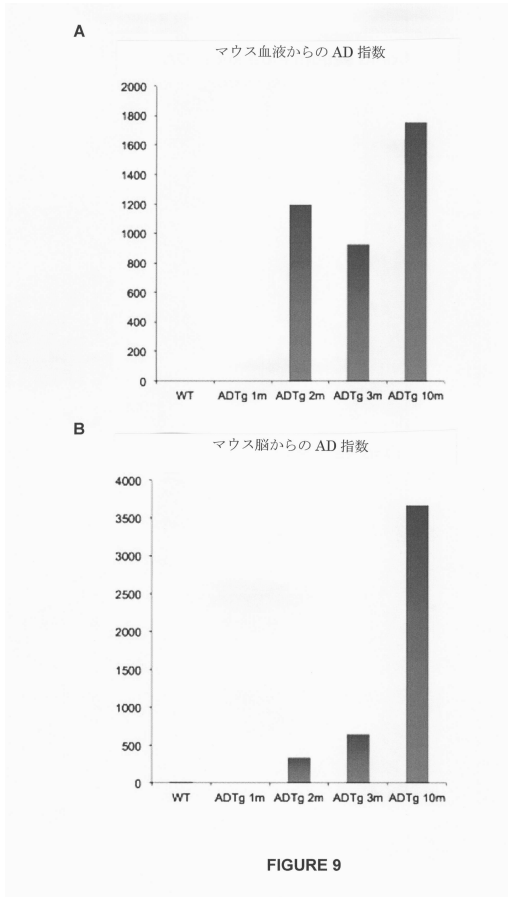


FIGURE 9

【 図 10 】

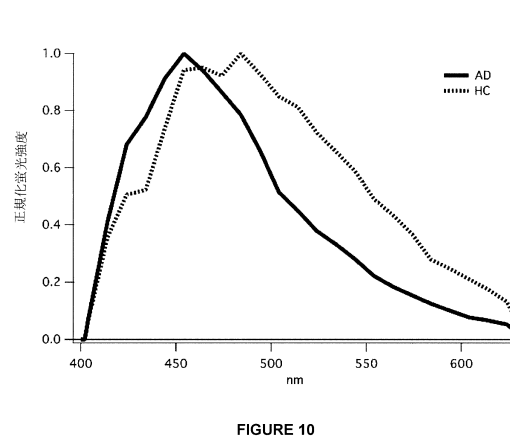
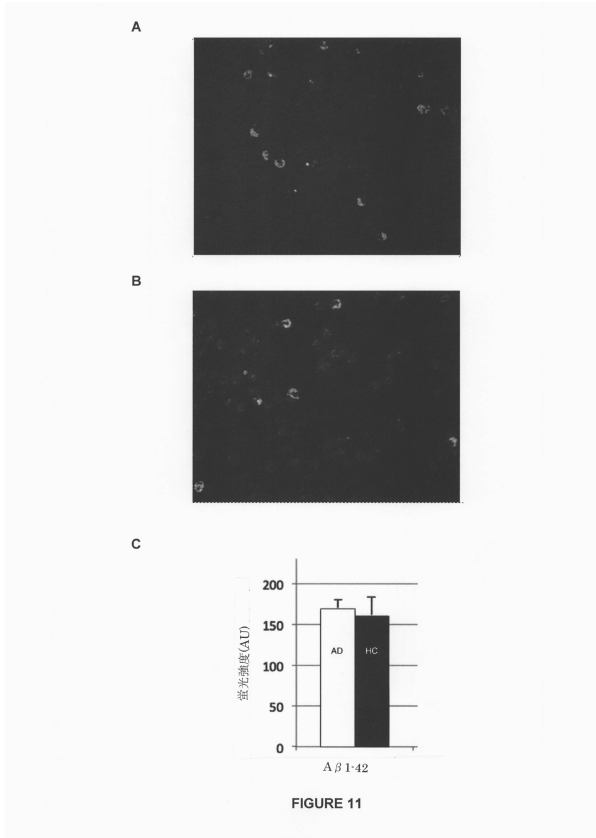


FIGURE 10

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

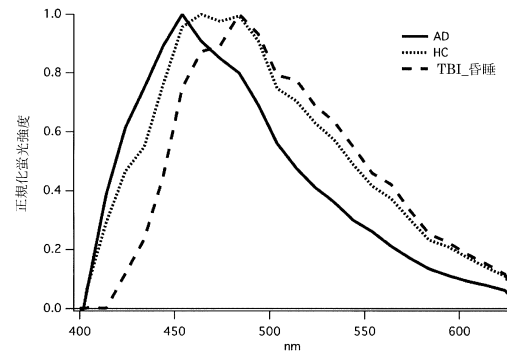
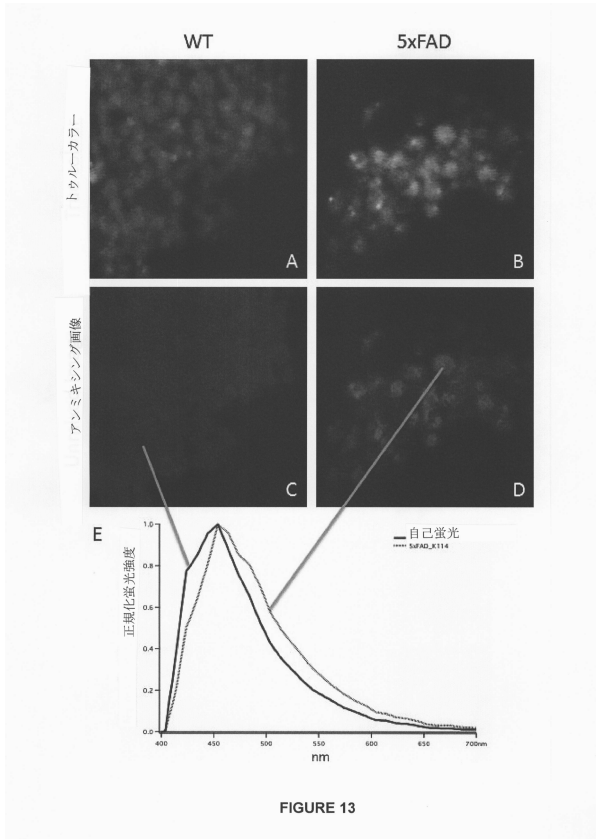


FIGURE 12

【 図 1 3 】



フロントページの続き

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ピーター・スタイズ

カナダ・アルバータ・T3Z・3M1・カルガリー・スプリングサイド・ストリート・43

(72)発明者 シゲキ・ツツイ

カナダ・アルバータ・T3G・0B9・カルガリー・ロイヤル・オーク・ドライブ・ノースウエスト・79

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特表2003-519383(JP,A)

特表2012-529659(JP,A)

小野寺 節, プリオンとプリオン病について, 平成13年度第1回食品技術講習会 講演要旨, 2001年 6月29日, 1-10

JUNG, SS et al., NEUROBIOLOGY OF AGING, 1999年, 20, 249-257

KIKO, T et al., PLOS ONE, 2012年11月15日, 7(11), e49620

STYREN, SD et al., THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY, 2000年, 48(9), 1223-1232

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

G01N 21/64 - 21/78

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	用于分析血液以检测与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法		
公开(公告)号	JP6456851B2	公开(公告)日	2019-01-23
申请号	JP2015561851	申请日	2014-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	彼得风格的 シゲキツツイ		
申请(专利权)人(译)	彼得·スタイズ 筒井茂树		
当前申请(专利权)人(译)	彼得·スタイズ 筒井茂树		
[标]发明人	ピータースタイズ シゲキツツイ		
发明人	ピーター・スタイズ シゲキツツイ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N21/64 G01N21/78 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2814 G01N2800/2821 G01N2800/2828 G01N2800/2835 G01N2800/2842 G01N2800/285 G16B20/00		
FI分类号	G01N33/68 G01N21/64.F G01N21/78.C G01N33/53.D		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	13/833008 2013-03-15 US		
其他公开文献	JP2016514266A5 JP2016514266A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种检测受试者中与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法，包括步骤：

(a) 使来自受试者的白细胞与结合病原性蛋白质聚集体的探针接触；

(b) 使病原性蛋白质聚集体接触并且检测结合的探针，其中白细胞中病原性蛋白质聚集体的存在表明受试者患有与异常蛋白质聚集相关的病症。在一个实施方案中，所述疾病是阿尔茨海默病，轻度认知障碍或创伤性脑损伤。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6456851号 (P6456851)
(45) 発行日 平成31年1月23日(2019.1.23)	(24) 登録日 平成30年12月28日(2018.12.28)	
(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	F
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78	C
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
請求項の数 45 (全 34 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-561851(P2015-561851)	(73) 特許権者 515259155	
(86) (22) 出願日 平成26年3月14日(2014.3.14)	ピーター・スタイズ	
(65) 公表番号 特表2016-514266(P2016-514266A)	カナダ・アルバータ・T3Z・3M1・カ	
(43) 公表日 平成28年5月19日(2016.5.19)	ルガリー・スプリングサイド・ストリート	
(86) 国際出願番号 PCT/CA2014/000250	・43	
(87) 国際公開番号 W02014/138919	(73) 特許権者 515259166	
(87) 国際公開日 平成26年9月18日(2014.9.18)	シゲキ・ツツイ	
審査請求日 平成29年3月9日(2017.3.9)	カナダ・アルバータ・T3G・0B9・カ	
(31) 優先権主張番号 13/833,008	ルガリー・ロイヤル・オーク・ドライブ・	
(32) 優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)	ノースウェスト・79	
(33) 優先権主張国 米国(US)	(74) 代理人 100108453	
	弁理士 村山 靖彦	
	(74) 代理人 100110364	
	弁理士 宍広 信哉	
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】異常タンパク質凝集と関連する疾患を検出するための血液の分析方法