

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4294953号
(P4294953)

(45) 発行日 平成21年7月15日(2009.7.15)

(24) 登録日 平成21年4月17日(2009.4.17)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26	3 1 5 H
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 27/26	3 1 5 F
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 27/26	3 0 1 A
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/15	Z

請求項の数 25 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-539821 (P2002-539821)	(73) 特許権者	502329441
(86) (22) 出願日	平成13年11月5日(2001.11.5)		アンスティテュ ナショナル ド ラ サ
(65) 公表番号	特表2004-522940 (P2004-522940A)		ンテ エ ド ラ ルシエルシュ メディ
(43) 公表日	平成16年7月29日(2004.7.29)		カル (イ. エヌ. エス. エ. エール. エ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2001/003410		ム.)
(87) 国際公開番号	W02002/037118		INSTITUT NATIONAL D
(87) 国際公開日	平成14年5月10日(2002.5.10)		E LA SANTE ET DE LA
審査請求日	平成16年10月21日(2004.10.21)		RECHERCHE MEDICALE
(31) 優先権主張番号	00/14143		(I. N. S. E. R. M.)
(32) 優先日	平成12年11月3日(2000.11.3)		フランス国 エフ-75654 パリ セ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		デクス 13 ル ド トルビアク 10
前置審査		(74) 代理人	100123788
			弁理士 宮崎 昭夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A P Pタンパク質の病的な変性を検出する方法およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分析試料中の内因性 A P Pタンパク質の病的な改変を検出する方法であって、
 該 A P Pがその病因に關与する、神経変性症状において、特異的改変を受けた A P Pのカルボキシ末端部分の異化および/または代謝の断片である、14.5 k D a以下の A P P - C末端断片により構成されるマーカーを使用し、
 前記断片は、該 A P Pの C末端部の1次構造は保持するが、電荷、等電点、溶解性の異なる変異体の形で存在している、該 A P Pの、異化および/または代謝の産物であり、
 該マーカーの量の減少、該マーカーの電荷あるいは等電点の相違、および/または該マーカーの溶解性の相違が、検出に用いられる
 ことを特徴とする方法。

【請求項 2】

検出において、14.5、13.5、12、10.5、および9.5 k D aの5個の断片、ならびに、これらの断片に由来する、等電点電気泳動により分離可能なイソ変異体を、A P P機能不全マーカーとして使用することを含む
 ことを特徴とする、請求項 1に記載の方法。

【請求項 3】

検出において、14.5、13.5、12、10.5、9.5、9、8.5、および6.5 k D aの8個の断片、ならびに、これらの断片に由来する、等電点電気泳動により分離可能なイソ変異体を、A P P機能不全マーカーとして使用することを含む

ことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

該マーカーの量の減少が検出に用いられることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

検出において、
14.5、13.5、12、10.5、および9.5 kDaの断片から選択される1～5個の断片、ならびに、これらの断片に由来する、等電点電気泳動により分離可能なイソ変異体を、APP機能不全マーカーとして使用し、

該14.5、13.5、12、10.5、および9.5 kDaの断片は、いずれも、アルツハイマー型神経変性病状において、特異的改変を受けたものである
ことを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 6】

検出において、
6.5 kDaの断片、ならびに、この断片に由来する、等電点電気泳動により分離可能なイソ変異体を付加的に使用することを含み、

該断片は、アルツハイマー型神経変性病状において、特異的な改変を受けたものであることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

検出において、
9 kDaの断片、ならびに、この断片に由来する、等電点電気泳動により分離可能なイソ変異体を付加的に使用することを含み、

該断片は、アルツハイマー型神経変性病状において、特異的な改変を受けたものであることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 8】

検出において、
14.5、13.5、12、10.5、9.5、9、8.5および6.5 kDaの断片から選択される1～5個の断片、ならびに、これらの断片に由来する、等電点電気泳動により分離可能なイソ変異体を、APP機能不全マーカーとして使用し、

該14.5、13.5、12、10.5、9.5、9、8.5および6.5 kDaの断片は、いずれも、アルツハイマー型神経変性病状において、特異的改変を受けたものである

30

ことを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

該マーカーの電荷あるいは等電点の相違が検出に用いられることを特徴とする、請求項 1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

リン酸化の指標の変化が検出に用いられることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

14.5 kDaのバンドA断片と13.5 kDaのバンドB断片のリン酸化の減少が検出に用いられる

ことを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

12 kDaのバンドC断片、10.5 kDaのバンドD断片、および9.5 kDaのバンドE断片のリン酸化の増加が検出に用いられる

ことを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

該マーカーの溶解性の相違が検出に用いられることを特徴とする、請求項 2 または 3 に記載の方法。

50

【請求項 14】

14.5 kDa のバンド A 断片および / または 13.5 kDa のバンド B 断片の溶解性の減少が、アルツハイマー病の病的症状の検出に用いられることを特徴とする、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

10.5 kDa のバンド D 断片、および / または 9.5 kDa のバンド E 断片の溶解性の増加が、アルツハイマー病の病的症状の検出に用いられることを特徴とする、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

該分析試料は、神経組織または神経細胞、非神経組織または非神経細胞、あるいは、脳脊髄液、血液、その構成要素の全部または一部を含む体液成分のいずれかを包含することを特徴とする、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 17】

特異的改変がなされる、該 APP のカルボキシ末端部分に対するポリクローナルおよび / またはモノクローナル抗体が、検出に利用されることを特徴とする、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

該 APP のカルボキシ末端部分のリン酸化に対して特異的な抗体を含む、ポリクローナルおよび / またはモノクローナル抗体のセットを付加的に使用し、

少なくとも、リン酸化型の修飾の検出を含む、APP - C 末端断片の病的な変性の翻訳後修飾を検出する

20

ことを特徴とする、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

使用されるポリクローナルおよび / またはモノクローナル抗体セットは、14.5、12、および 10.5 kDa 断片のリン酸化および、その発現量の変異の検出を可能にすることを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

分析試料中で同定された断片にインデックスを割り当てることによって病状の程度を評価し、

このインデックスは、インデックス 0 (ゼロ) は、健常組織における検出に、かつ、インデックス 100 は、異常組織における検出に対応するという基準に基づき、割り当てられる

30

ことを特徴とする、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

アルツハイマー型神経変性疾患の特定およびモニタリング、アルツハイマー型神経変性疾患の動物モデルの開発、ならびに、アルツハイマー型神経変性疾患に対して有効な薬物のスクリーニングを目的として、該マーカーの検出が利用される

ことを特徴とする、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

アルツハイマー型神経変性病状の鑑別特定のため、あるいは、該アルツハイマー進行の検出を目的として、該マーカーの検出が利用される

40

ことを特徴とする、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

アルツハイマー病における実験モデル、細胞または動物モデルを確立する、および / または有効性を確認するための、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法の使用。

【請求項 24】

ヒト組織試料、ならびに実験モデルにおける、アルツハイマー型神経変性病状の検出のための、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法の使用。

【請求項 25】

該 APP のカルボキシ末端部分の異化および / または代謝に基づき、アルツハイマー病

50

に対する治療処置の効果を検証するため、および/または治療処置の是正を図るための、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病などの神経変性疾患におけるAPPタンパク質（アミロイド前駆体タンパク質）の病的な変化（pathological transformation）を検出する手段に関する。

【0002】

本発明は、より詳細には、かかる変化を検出する方法、それに供するキット、ならびにその治療および診断への応用に関する。

10

【0003】

アルツハイマー病（AD）は、知的機能の喪失、従って、進行性かつ不可逆な痴呆の発症をもたらす神経変性疾患である。この疾患は、加齢が主要な危険因子であるので、人口の高齢化につれ、将来の主要な問題の一つになりつつある。

【0004】

観察される型のうちの99%は、非家族性である。家族性常染色体優性型の場合、病的な変異が、第21番染色体のAPP遺伝子上、ならびに第14番と第1番染色体に見られるPS1およびPS2（プレセニリン（preseniline）1および2）遺伝子上で観察される。

【0005】

二通りの変性プロセスがアルツハイマー病の特徴となっている。APPタンパク質の機能不全に起因するアミロイド形成と、神経細胞内のタウ・タンパク質の蓄積に対応する神経原線維変性（NFD）である。

20

【0006】

APPタンパク質の機能不全は、アルツハイマー病状のまさしく原因であるが、神経の変性および死の明確な原因は未だ解明されていない。

【0007】

2つの仮説が提唱されている。最も普及している、第一の仮説によれば、APPの切断産物である、39～43のアミノ酸残基を含むAβペプチドは、神経毒であり、NFD連鎖反応の誘因である。

30

【0008】

第二の仮説によれば、アミロイド斑の形態へのAβペプチドの蓄積によって、並行してかつ副次的に変形される、該変性は、APP機能の喪失または獲得から引き起こされる。

【0009】

変異されたAPPあるいはAPP+PS1遺伝子を有するトランスジェニック・マウスのおかげで、アミロイド形成のモデル化が可能となっている。このマウスでは、進行的にアミロイド斑を発現させるものの、しかし、NFDは観察されない。このマウスは、Aβペプチドの生成を阻害できる分子を試験するために、医薬業界で既に利用されている。その基本戦略は、Aβペプチドの産生に関与する酵素を妨害することからなる。現在知られている、このタイプの酵素は、およびセクレターゼである（1）。

40

【0010】

アミロイド沈着物上に固着さえる分子も試験されている。この分子は、構造の破壊剤（シートブレーカー）または抗アミロイド化剤である（2）。

【0011】

アミロイド・ペプチドに対するワクチン接種も評価段階にある（3）。

【0012】

現時点では、アルツハイマー病に罹患したヒト組織内において、APPタンパク質の有意、かつ確実な変異は、1-42Aβペプチド産生の増加、1-42/1-40Aβ比の増加、ならびにその不溶沈着物およびアミロイド斑の形態の凝集以外は、発見されていない。

50

【 0 0 1 3 】

s A P Pとして知られる、A P P N末端部分の分泌物の変異も、A P P上の7 1 5変異の *i n v i t r o* 試験で報告されている(4)。

【 0 0 1 4 】

本発明者らが実施した研究は、A ペプチドの検出とは結びつかないが、アルツハイマー病のヒト組織中、ならびに、実験モデル中において、特異的に検出可能である、A P P タンパク質の重要な改変に気付かせた。

【 0 0 1 5 】

これらの改変は、アルツハイマー病の影響を受けたヒト組織(中枢神経系、末梢の体液および組織)中で、ならびにA P Pの機能不全を伴う他の神経変性病状中において、明らかにされている。

10

【 0 0 1 6 】

該重要な改変は、定性的かつ定量的であり、A ペプチド産生の上流において、検出される。

【 0 0 1 7 】

同様な異常は、A P P上の病的な変異、あるいは、変異A P Pと変異プレセニン1を有するトランスジェニック・マウスにおいても、多数見出される。

【 0 0 1 8 】

従って、本発明は、A P Pの病的な改変の、特に、神経変性過程における、検出方法における、マーカーとしての、ヒト大脳組織内で観察されるこれら改変の利用に関する。

20

【 0 0 1 9 】

本発明は、特に、神経変性過程の診断およびモニタリング、動物モデルの開発、ならびに、A P P病状に対して有効な薬物のスクリーニングに対する、これらマーカーの使用に関する。

【 0 0 2 0 】

本発明は、基準の系に対して設定されたインデックスの定義を含む、前記病状の評価方法にも関する。

【 0 0 2 1 】

分析試料中のA P Pタンパク質の病的な改変を検出する方法は、該A P Pがその病因に関与する、神経変性症状において、特異的改変を受けたA P Pのカルボキシ末端部分の異化および/または代謝の断片、以降A P P - C末端断片と称する、により構成されるマーカーを使用することを特徴とする。

30

【 0 0 2 2 】

本発明者らが実施した研究は、予期せぬことに、かかる断片をもたらす改変は、特に、アルツハイマー病の場合において、大脳領域中の変性過程の開始と進行に直接連結されていることを解明した。

【 0 0 2 3 】

問題の断片は、A P P - C末端の一次構造を保持している、A P Pの異化および/または代謝の産物であり、従って、このA P P - C末端部分に対する抗体によって認識されることが観測されている。

40

【 0 0 2 4 】

従って、本明細書および請求の範囲で使用する「断片」という用語は、実施例に記載されるように、これら変異体は、抗A P P - C末端抗体で認識される程度に、例えば、リン酸化および/またはメチル化および/またはアセチル化および/またはグリコシル化などの、翻訳後修飾のために、電荷あるいは等電点が相違している変異体(*charge and isoelectric point variants*)をも包含する。

【 0 0 2 5 】

これらは、特に、抗A P P - C末端ポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセット、さらには、A P P - C末端の病的改変体の翻訳後修飾に対する抗体のセットによる、免疫プロットと検出を組み合わせ、1 - D電気泳動(1次元電気泳動)または2

50

- D電気泳動(2次元電気泳動)による、分析試料の生化学的分析により同定されえる断片である。

【0026】

該電気泳動は、1次元および/または2次元とすることができる。

【0027】

かかる断片は、病的な組織中において、特異的な改変を受ける。神経変性過程の進行に伴って、これら断片のうちの、特定のものの減少が、さらには、消失すらも、見出されている。同時に、これら断片のうちの、特定のものの、電荷の変異、ならびに溶解性の変化が、見出されている。

【0028】

本発明は、特に、アルツハイマー化進行の診断のためにこの方法を適用することに関し、すなわち、APP機能不全マーカーとしての、1次元(1-D)電気泳動法で決定される、その分子量は、14.5、13.5、12、10.5、および9.5 kDaである、アルツハイマー化の過程に改変を受ける、5個の主要な断片の利用に関する。便宜上、これらの断片を、A、B、C、D、Eの文字で表す。9 kDa(F)のバンドも存在し、6.5 kDaのバンドも、より少くかつ変動する量であるが、存在することにも注記する。

【0029】

消失する変異体は、Aで表す14.5 kDaの1-D電気泳動バンドに対応し、2-Dでは、15 kDaと14.5 kDaの2成分に分離され、15 kDa成分は、等電点が5.13(15/5.13と表す)および15/5.37の、また、他方の成分は、14.5/5.64および14.5/5.95の、等電点変異体(isoelectric variants)を含んでいる。13.5/4.94、ならびに12.7/4.8; 12.7/5.29の等電点変異体を含む、13.5と12.7 kDaの2成分に分離される、13.5 kDaの電気泳動バンドBに相当する断片も消失する。

【0030】

アルツハイマー病の早期段階において、有用な断片も修飾を受ける。それらは、電気泳動変異体(electrophoretic variants)15/4.55、14/5.2、14/5.37、12.7/5.45、12.7/5.64、10.5/5.91、12.7/6.05に相当する。これらの変異体は、初期マーカーとなる程度に、特に情報を与える。

【0031】

アルツハイマー化中に出現する断片は、11/4.94、10.5/5.35、10.5/7.5の等電点変異体を含む、2-Dでは、11 kDaと10.5 kDaの二成分に分離される、10.5 kDaの1-D電気泳動バンド、ならびに、9.5 kDa、pI 5.77の断片に相当する。

【0032】

同時に、APP-C末端マーカーの溶解性の変化も、神経変性の病理過程の進展に伴って観察される。大脳組織のアルツハイマー化の間に、14.5と13.5の断片は、その溶解性の減少を示し、10.5と9.5の断片は、その溶解性の増大を示す。

【0033】

かかる断片は、「アルツハイマー化を受けた(alzheimerized)」と評される組織または細胞中において、改変を受ける。それらは、アルツハイマー病理に関与する、変異遺伝子または非変異遺伝子、あるいは遺伝子の組合せを保持しているトランスジェニック動物などの実験モデルにおいても、同様に改変を受けることがある。

【0034】

APP-C末端マーカーにおいて観測されるような、APPタンパク質の異化および代謝における、これらの相違は、神経細胞モデル(例えば、SKNSH SY5Y系統、NT2系統、Kelly系統などの神経芽細胞腫細胞)、グリア芽細胞腫系統(CCF、U118、T98)のみならず、CHO、COS、HT-29、HeLa系統など非神経細胞

10

20

30

40

50

でも観察されることは、興味深く注目される。

【0035】

各細胞系は、元来、それ独自のこれら断片の発現パターン（細胞モデルの全タンパク質に対する、発現された分子量13.5、12、10.5、9.5、9、8.5、および6.5 kDa断片の総量の変動；各断片間の相対比の変動）を有することも注目される。

【0036】

これらのモデルでは、各モデルに特異的な挙動で、細胞系統の分化状態に応じて、断片A～Fの発現も変更を受ける。

【0037】

これらの変動は、動物モデル、特に、可能な異なる構成（APP変異体および/またはPS1あるいはPS2変異体および/またはPS1発現欠如）および/または変異もしくは非変異タウ遺伝子（14.5、13.5、12、10.5、9.5、9、8.5、および6.5 kDa）を有するトランスジェニック・マウスにおいても観察される。

10

【0038】

したがって、前記方法に用いられる分析試料には、神経組織もしくは細胞系統ならびに非神経組織もしくは細胞系統、例えば、脳脊髄液、血液、その構成要素の全部または一部などの体液（biological liquids）が含まれ、それは、早期診断、患者における危険因子の評価、または治療モニタリングを容易とする。

【0039】

これらの組織を、該検出方法における使用を目的として、ホモジナイズまたは、例えば、遠心分離によって、分画すると有益である。

20

【0040】

上記方法は、レヴィー小体を伴う痴呆やアミロイド血管症などの、アルツハイマー病に関係する神経変性病状の鑑別診断にも利用される。

【0041】

上述の検出方法は、病気と関連するタンパク質へのAPPタンパク質の変異の指標を規定することを可能とする。

【0042】

本発明は、特に、実施例に記載されるような、免疫化学的分析により分析試料中の神経変性の病理過程を評価する方法であって、インデックス0（ゼロ）は、健常組織における検出、インデックス100は、異常組織における検出に相当する、基準の系を参照して、ヒトの、あるいはアルツハイマー病に関係している遺伝子変異を有するトランスジェニック・マウス、あるいは、天然型細胞系統、または前記遺伝子のトランスフェクト体に由来する、試験試料中において同定される断片にインデックスを割り当てることを特徴とする方法に関する。

30

【0043】

かかるインデックスは、診断および治療上の利点を有する。それは、病的状態を迅速に反映することを可能とする。インデックス値は、実際に、アルツハイマー病を発症する危険があるか否かを判定することを可能とする。高いインデックスが得られたならば、臨床診断の裏付けに役立つ。

40

【0044】

また、APPの異化と代謝ならびにその調整に基づく治療処置の目的において、かかるインデックスの変異は、治療の効果をモニターすることを可能とする。

【0045】

それは、アルツハイマー病または他の神経変性病状に対する様々な分子の効果を比較することを可能とする基準を構成し、該インデックスの変異は、被験分子の有効性ならびにその治療上の有用性の可能性を示す。

【0046】

かかるインデックスの利用は、該疾患の要因となる早期の病因事象の解析においても利点を示し、新しい有効な分子の発見、ならびに新しい治療戦略の開発をもたらす。

50

【0047】

このインデックスは、変性を遅くするために、さらには、新たな実験モデルを確立するために、変性を誘発する上でも、利用できることも特筆される。このインデックスは、当該細胞集団の消失を要する治療措置の範囲内において、特定とする変性を誘起することを可能とする情報をも提供する。

【0048】

本発明にかかる方法は、加えて、APP-C末端断片の病的な変異の翻訳後修飾、特にリン酸化および/またはメチル化および/またはアセチル化および/またはグリコシル化型の修飾を検出するための、ポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセットを使用すると有益である。

10

【0049】

使用するポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセットは、14.5、12、10.5 kDa断片のリン酸化および発現の変動を明らかにすることができることが好ましい。

【0050】

本発明にかかる検出方法は、アルツハイマー病の実験モデル、細胞、または動物モデルを確立する、ならびに有効性を検証するために、好適に利用することができる。該適合するモデルは、実施例に記載するように、ヒト組織において観察されるAPP-C末端断片の改変を再現する。

【0051】

患者の選別性を改良することによって、有効な治療試験を確立する上で、それを役立たせることもできる。

20

【0052】

大いに興味深い、別の使用は、アルツハイマー型の神経変性病状に対して効果的な薬物を選択するための薬理学的スクリーニングに関するものである。すなわち、選択される分子は、APP-C末端マーカの諸特性の修復、またはそれらの物理化学的諸特性(溶解性、電荷)の修復へと導くことで、アルツハイマーの上記徴候を緩和できる点に特徴がある。

【0053】

従って、本発明により、有用な分子の迅速で正当な薬理学的スクリーニングを実施することが可能となる。

30

【0054】

本発明は、また、APPのカルボキシ末端領域に対するポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセットを含むことを特徴とする、APPの病的な変異の診断用キットにも関する。例えば、これら断片上のリン酸化、メチル化、アセチル化、またはグリコシル化の部位などの、APP-C末端断片上に位置する、病的な変異と関連している翻訳後修飾に対する抗体のセットの使用は、APP-C末端断片の病的な変異の立証と定量化に関する、付加的な情報を提供するの有益である。

【0055】

2-D電気泳動によって示されるAPP-C末端断片の異種混交性は、リン酸化トレオニン668(APP695における番号で示すと)に対するリン依存性(phospho-dependant)ポリクローナル抗体により実証されるように、APP-C末端断片に共通する領域に位置する、リン酸化修飾によって、部分的には説明される。

40

【0056】

それは、APP-C末端断片の特性(profile)を変更する、抗グリコシル化(anti-glycosylation)薬で示されるように、グリコシル化によっても生じる。メチル化およびアセチル化も、APP-C末端断片の病的な変異に関与する、二種類の翻訳後修飾である。実際、それらは、実質的にリジン残基上に局在しており、酸性化を、それに伴い、等電点の変化を引き起こす。

【0057】

50

これらは、アルツハイマー病に關与する遺伝子による制御の結果でもある。この方法によって、タウタンパク質の過剰発現は、13.5、9.5、および6.5 kDaバンドの比に影響することがある。

【0058】

これらの抗体は、例えば、ELISA、ウェスタン・ブロット、ドット・ブロットなど、免疫化学的アッセイにおいて、使用することができる。従って、本発明にかかるキットは、かかるアッセイを実施する上で必要な要素をも含むと便利である。

【0059】

本発明の別の特徴および利点は、それぞれ後述する内容を示す図1～16を参照して、以下の実施例において、明らかにする。

材料と方法

抗体

APP - C末端 - C17ポリクローナル抗体の製作

APPのカルボキシ末端部分に対するポリクローナル抗体を、Vaitukaitis等(5)により記述された免疫プロトコルに従って製作した。ニュージーランド・ラビットを、そのカルボキシ末端に相当する、ヒトAPP配列の最後の17アミノ酸を含んでなるペプチドで免疫した。該ペプチドは、共有結合で卵白アルブミンに結合させた。免疫源200μgを2週ごとに注射した。注射前に、最初の感作では、フロイント完全アジュバント1容を免疫源溶液に添加し、また、後続の感作では、完全アジュバントに代えて、フロイント不完全アジュバントを用いた。4回目の注射の後1週目、ならびに、後続の各注射後の1週目に、採血した。血液凝固と、2000gで10分間の遠心分離の後、純粋な血清が得られた。グリセロール1容をこの血清に添加し、この混合物を-20℃で保存した。

【0060】

APP - C末端 - C17抗体の精製

免疫化に使用したペプチド1mgを、製造者の指示書に従って、NHS - Fast Flow Sepharose (登録商標)マトリックス (Amersham Pharmacia Biotech) に結合させた。該担持済みマトリックスを、2×結合緩衝液 (pH 8.0のトリス 50mM; NaCl 300mM; Tween - 20 0.1% (v/v)) 1容中に希釈した純粋血清200μlに接触させ、4℃で終夜軽く攪拌した。該溶液全てを、PD - 10カラムに載せた。該マトリックスを、上記結合緩衝液10容で洗浄した。精製済み抗体は、pH 3.5のアセテート緩衝液2容によって溶出させた。そのタンパク質濃度は、Pierce社のBCAタンパク質定量キットを用いて決定した。

【0061】

APP - 668Pポリクローナル抗体の製作

APP - C末端 - C17に対して使用したと同じプロトコルに従って、Val - Asp - Ala - Ala - Ala - Val - (リン酸化) Thr - Pro - Glu - Glu - Arg - His - Leuの配列に相当する合成ペプチドに対する抗体を製作した。この抗体は、上記免疫源を認識するが、同一配列を持つが、リン酸化されていないペプチドは認識しない。

【0062】

標本

ヒトおよびネズミの脳組織の標本

ヒト脳組織は、以前よりモニターしていた患者に由来するもので、(6)に記載されている。剖検または生検によって取得し、-80℃で保存した、この脳組織標本は、解剖図録を用いて解剖し、次いで、1×1-D溶解緩衝液 (pH 6.8の50mMトリス - HCl; 4mM EDTA; SDS 5% (w/v)、グリセロール 10% (v/v)、β-メルカプトエタノール 2% (v/v)、プロモフェノールブルー 0.05% (w/v)) 10容中で、テフロン (登録商標)ポッター (potter)を用いて、1-D分析用

10

20

30

40

50

にホモジナイズした。該試料は、10分間、100 で処理し、その後、使用するまで -80 に維持した。2-D分析の場合、該組織を、10mM トリス-HCl pH6.8 緩衝液中でホモジナイズし、次いで、それに2x2-D緩衝液(尿素 7M; チオ尿素 2M; 0.4% Pharmalytes (登録商標) 3~10% (w/v)、Triton X-100 8% (v/v)、ジチオスレイトール 10mM、プロモフェノールブルー 0.1%) 1容を添加し、使用するまで -80 で保存した。げっ歯動物の脳組織標本の場合、動物の死後、速やかに脳を摘出し、ヒトの標本と同様の方法で処理した。

【0063】

使用したネズミの系統

ネズミ脳組織の標本を、ヒト脳組織の標本と同じプロトコルに従い調製した。脳組織の標本を、非トランスジェニック・マウス、および野生型ヒトAPP遺伝子 (APPwt) または670番と671番のコドンに変異のあるヒトAPP遺伝子 (APPsw) を有するトランスジェニック・マウスから採取した。このAPPの変異は、スウェーデン型変異 (Swedish mutation) (7) として知られる、家族性アルツハイマー病と関連がある。非トランスジェニック・マウス、およびAPPwt、APPsw遺伝子を有する異系統のトランスジェニック・マウスを含む別の標本も使用した。Hsiao K. 等 (8) が開発したトランスジェニック・マウスと同様のネズミ脳組織の標本も使用した。

【0064】

タンパク質分画後の脳組織の試料

脳組織標本を、10mM トリス-HCl pH6.8 緩衝液中1/10 (w/v) の比でホモジナイズし、次いで、4 で1時間、100,000gで遠心分離した。その上清 (F1) を確保し、Triton X-100 0.5% (v/v) を含む同一緩衝液中で再度ホモジナイズしたペレットを、それに添加した。遠心分離後、F2画分と称する、可溶性Triton X-100画分を保存する。追加の抽出および遠心分離工程を、同一緩衝液中同一条件下で実施して、F2'画分を作製する。次いで、このペレットを、素早く1-D溶解緩衝液(下記参照) 中に取り、F3画分とする。

【0065】

用いた生化学的手法に従って、使用時に、以下の対応する緩衝液を上清に添加した: 1次元(1-D)電気泳動分析用には、2x1-D溶解緩衝液(pH6.8の100mM トリス-HCl; EDTA 8mM; SDS 10% (w/v); グリセロール 20% (v/v); -メルカプトエタノール 4% (v/v)、プロモフェノールブルー 0.1% (v/v)) 1容、2次元(2-D)電気泳動分析用には、2-D溶解緩衝液(尿素 7M; チオ尿素 2M; 0.4% Pharmalytes (登録商標) 3~10% (w/v); Triton X-100 4% (v/v); ジチオスレイトール 10mM; プロモフェノールブルー 0.1%) 1容。

【0066】

免疫沈降

APP-C末端断片を免疫沈降するために、F2画分を使用する。F2画分100μlを、NP.401%を含む10mM トリスHCl pH7.4 緩衝液(免疫沈降緩衝液) 300μl中に希釈した。10μlのAPP-C末端-C17抗体またはAPP668P抗体を添加し、その混合物を攪拌下4 で終夜インキュベートする。プロテインA固定アガロース・ビーズ (protein A fixed on agarose beads) (Pierce) 40μlを該溶液に添加し、その混合物を攪拌下4 で1時間インキュベートする。そのアガロース・ビーズを免疫沈降緩衝液中で3回洗浄し、次いで、SDS緩衝液50μlで処理して、APP-C末端断片を遊離させ、遠心分離上清中に回収した。次いで、該APP-C末端断片は、トリス-トリシゲル上で電気泳動後、免疫ブロット法により分析した。

【0067】

10

20

30

40

50

CHO (ハムスター) または SKNSH SY5Y (ヒト) 培養細胞試料

細胞は、野生型ヒトAPP遺伝子またはスウェーデン型変異を有するヒトAPP遺伝子を用いて、安定した形でトランスフェクトする。細胞のペレットを、10 mM トリス-HCl pH 6.8 緩衝液中に取り、次いで、超音波にかけた。使用前に、(1-D または 2-D) 実験に対応する、2 × 溶解緩衝液 1 容を試料に添加する。1-D 分析の場合、該試料を 10 分間 100 にする。

【0068】

ヒト白血球の試料

ヒト白血球の調製:

血液 10 ml を EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 管中に採集する。遠心分離を 15 分間、4500 rpm (毎分の回転数) で実施する。血漿を除去する。管に、赤血球の溶解用の溶液 (溶解溶液: NH_4CO_3 0.91 mM、 NH_4Cl 0.132 mM) を、その 2/3 まで満たす。該管を静かに攪拌し、5 に冷却した水浴中に置く。4000 rpm で 15 分間の遠心分離を実施し、上清を除去する。同じ方法に従って、白血球のペレットを、前記溶解溶液で 2 回洗浄する。次いで、該ペレットの水分を除去し、24 時間以内に使用するか、あるいは輸送または後日使用するために -20 で凍結させる。

10

【0069】

白血球のペレットを、10 mM トリス-HCl pH 6.8 緩衝液中に取り、次いで、超音波にかける。使用前に、(1-D または 2-D) 実験に対応する、2 × 溶解緩衝液 1 容を、該試料に添加する。1-D 分析の場合、試料を 10 分間 100 にする。

20

【0070】

電気泳動法1-D 電気泳動

Protean IIXi Cell 電気泳動システム (Biorad) を用いて、製造者の指示書に従って実験を実施した。

【0071】

Laemmli (9) によって記述された、ゲル製造用プロトコルに従って、また、Schagger および Von Jagow (10) によって記述された泳動条件下で、1-D 電気泳動を実施した。濃縮ゲルは、4% のアクリルアミドを含有し、使用した分離ゲルは、16.5% のアクリルアミドを含有する。泳動は、トリス-トリシン緩衝液中で行う。使用した泳動プログラムは、以下の通りである: 1 時間 30 V 一定、次いで、45 mA で 16 時間。

30

【0072】

各ウェルには、等量 (約 100 μg / ウェル) のタンパク質を載せた。

【0073】

2-D 電気泳動1 次元

製造元の指示に従って、pH 3 ~ 10 の勾配をカバーしている、IPG Strip (登録商標) として知られるプレキャスト・ゲル・ストリップを用いて、1次元、すなわちフォーカシング (focusing) を実施する。等電点フォーカシングに使用する材料は、Protean IEF Cell システム (Biorad) である。

40

【0074】

1 × 再水和緩衝液 (尿素 7 M、チオ尿素 2 M、triton X100 4%、CHAPS 0.5%、pH 3 ~ 10 の Pharmalytes (登録商標) 0/2% (w/v)、DTT 10 mM、オレンジ G 0.01%) を、タンパク質 250 μg に添加して、使用用の 400 μl とする。該試料 400 μl を、装置中に設置したストリップに載せる。これを 1 時間静置して、受動的に再水和させ、次いで、50 V / ストリップで 10 時間保ち、能動的に再水和させ、次いで、製造者の指示書に従って、前記プログラムを開始する。フォーカシング後、このストリップを使用するか、-80 で保存する。

【0075】

50

2次元

使用前に、ストリップを1-D緩衝液(pH6.8のトリス 50mM;グリセロール 10%(v/v);β-メルカプトエタノール 2%(v/v);SDS 2%(w/v);プロモフェノールブルー 0.05%(w/v))中で30分間平衡化し、次いで、アクリルアミド 16.5%の1-D分離ゲル上に置く。該ストリップを、アガロース 1%(w/v)溶液で回収する。その後の手順は、単一の1-D電気泳動と同じである。

【0076】

メンブレンへの転写と免疫プロット法転写

Pharmacia LKB multiphor(登録商標)セミドライ転写システムを用いて、製造者(Amersham-Pharmacia Biotech)の指示書に従って、転写を実施した。タンパク質は、0.8mA/cm²でHybond(登録商標)ECLニトロセルロース・メンブレン(Pharmacia-Amersham)に転写した。

10

【0077】

免疫プロット法

該メンブレンを、スキムミルク5%(w/v)を含有する緩衝液(pH8.0のトリス 15mM;NaCl 150mM;Tween(登録商標)-20 0.5%(v/v))中で60分間インキュベートし、次いで、スキムミルクは含まず、0.5%に代えて、Tween(登録商標)-20を0.1%含有する同じ緩衝液で洗浄する。

20

【0078】

該メンブレンを、インキュベーション緩衝液(pH8.0のトリス 15mM、NaCl 150mM、Tween-20 0.1%(v/v)、スキムミルク3%(w/v))中で、最終希釈度1/2000(v/v)に希釈されるAPP-C末端-C17抗体と共に、室温で2時間、または4で終夜インキュベートする。

【0079】

メンブレンを、スキムミルクを含まないインキュベーション緩衝液中で3回各10分間洗浄する。

【0080】

次いで、該メンブレンを、Raifortペルオキシダーゼを結合させた抗ウサギヤギ免疫グロブリンと共に、スキムミルクを含まないインキュベーション緩衝液中、最終希釈度1/4000(v/v)で、室温で1時間インキュベートする。そのメンブレンを、スキムミルクを含まないインキュベーション緩衝液中で3回各10分間洗浄し、ECL(登録商標)化学ルミネッセンス・キット(Pharmacia-Amersham Biotech)を用いて、製造者の指示書に従って、その免疫反応性ポリペプチドを呈色させる。

30

結果

APPの異化および/または代謝による切断の概念的な概要を、図1(A)に、また、利用した抗体のエピトープの位置を、図1(B)に示す。

【0081】

ヒト大脳組織の1-D分析

1-D分析の方法の欄に記載されるように調製した、ヒト大脳組織の試料を載せ、分析した。電気泳動分離は、上述のトリス-トリシン条件で行った。ImageMaster(登録商標)1-D Eliteソフトウェア(Amersham-Pharmacia Biotech)を用いて、この断片の分子量を決定するために、検定済みの分子量マーカー(Biorad)を併行して載せた。

40

【0082】

電気泳動で分離されたタンパク質の転写、ならびにAPP-C末端-C17抗体による免疫プロットを、上述の通りに実施した。結果を、図2のA1に示す。

【0083】

50

正常組織の分析

コントロールのヒト大脳組織においては、見掛けの分子量が、A 14.5 kDa ; B 13.5 kDa ; C 12 kDa ; D 10.5 kDa ; E 9.5 kDa のA、B、C、D、およびEと名付ける6本のバンドが、APP - C末端 - C17ポリクローナル抗体により見出される。それらは、ヒト大脳生検組織およびコントロール被験者の死後大脳組織の双方において検出される(図2、A2 ; レーン 1 : 生検 ; レーン 2 および 3 : 剖検)。各試料の死後の経過時間を、時間(h)で示す。断片の特性は、死後の期間では、改変を受けないことに注意されたい。従って、該5個の断片は、死後に産生されることがある異化酵素活性に由来したものではない。

【0084】

10

アルツハイマー病の様々な段階にある患者由来の組織の分析

A) アルツハイマー化中における、APP - C末端断片の量の減少

図2Bは、同一試料および同一免疫プロットにおける、1999年のDelacourte等の分類によるタウ病因(tau pathology)(図2、B1)の、ならびにコントロール被験者(レーン1および2)および2人のアルツハイマー病患者(レーン3~6)におけるAPP - C末端断片(図2、B2)の分析を示す。海馬(Hip、レーン1、3、5)および後頭皮質(OC、レーン2、4、6)の二カ所の大脳領域を調べた。疾患に伴う、APP - C末端断片の減少が認められる。この消失は、神経変性的な損傷の重篤さと相関する。実際に、APP - C末端断片は、69、64、および60kDaのタウ病因性タンパク質のトリプレットの存在(Delacourte等(6))によって示される(図2、B1)、タウ病因により侵襲された領域中では消失する(図2、B2)ことは注目される。

20

【0085】

多数の患者の統計学的研究から、タウ異常の程度によって示される病理過程の進行と、分析される大脳組織標本中のAPP - C末端断片量の減少との間に、極めて高い相関があることが判明している。

【0086】

APP - C末端量を、コントロール・ケース(Ctrl)、痴呆はないがアルツハイマー病に特徴的な病変部を持つ患者に相当する前臨床(infraclinical)ケース(infraAD)、アルツハイマー病(AD)の臨床ケース、およびアルツハイマー病の家族性常染色体優性ケース(FAD、AD)(図2、C)の4グループの患者の皮質において、決定した。Mann-Whitney非母数統計検定は、コントロールCtrlと対比すると、infraADおよびADグループが有意に減少することを示している(infraAD: p < 0.03 ; AD p < 0.002)。APP - C末端の平均減少量は、コントロールグループと比較して、infraADグループでは、1/1.5倍に、ADグループでは、1/1.7倍に減少する。infraADとADグループの間では、APP - C末端減少量には有意な相違はない。これは、このAPP - C末端の減少は、アルツハイマー医学的病理の初期の現象であることを示している。

30

【0087】

コントロール患者の側頭皮質内のタウ異常と、アルツハイマー病の様々な段階とに対する、APP - C末端の発現レベルと間の相関の統計学的研究を実施した(図2、D)。研究対象の各患者の皮質中にて検出されるAPP - C末端の量と、側頭皮質内ならびに後頭皮質内の、それぞれのタウ異常の様々な程度との間に有意な相関が認められる。

40

線形回帰

	n	r	p
側頭皮質	26	0.614	0.0009
	n	r	p
後頭皮質	22	0.457	0.0324

B) アルツハイマー化過程中的APP - C末端断片の変異

APP - C末端断片は、二相において抽出することが好ましい：非イオン性界面活性剤

50

Triton X100含有緩衝液溶液(F2画分)、ならびにイオン性界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)含有溶液(F3)(図3、A)。

【0088】

大脳組織のアルツハイマー化において、APP-C末端断片の溶解性における、特異的な変化が観測される(図3B)。F2画分中においては、分子量9.5(断片E)および10.5kDa(断片D)のAPP-C末端断片の溶解性が増大し、F3画分中においては、分子量13.5(断片B)および14.5kDa(断片A)のAPP-C末端断片の不溶性が増大することが認められた。

【0089】

正常および病的なヒト大脳組織の2-D分析

3人の患者に対する結果を、図4(A~C)に示す。

【0090】

- アルツハイマー型大脳病変部のない1コントロール患者(Delacourte等(6))による段階0(図4A)
- アルツハイマー病の臨床段階の極初期にある1患者(Delacourte等(6))による段階6(図4B)。

【0091】

矢印は、APP-C末端-C17ポリクローナル抗体を用いて検出されるスポットを示す。それらの分子量は、1-D免疫プロットで観察される値とほぼ同じである。それらの等電点は、pH4.5~7.5の範囲にある。

【0092】

アルツハイマー病の進行に伴う、該スポットの分布における変異が注目される(図4、C)。アルツハイマー病のさらに進んだ段階にある患者では、その断片をもはや検出することができないので、この手法で研究することはできない。

【0093】

2-D分析によって検出されるAPP-C末端の変異体を、Y軸は、分子量を、X軸は、等電点を示す、2次元の較正されたグリッド上に模式的に図示する(図4、C)。分子量および等電点の内部標準を用いて、全体を較正した。該等電点のコントロールは、-エノラーゼ(47/4.94)、-アクチン(42/5.29)、および-エノラーゼ(47/6.99)である。5.54および8.05の等電点は、大脳組織内部の標準である。

【0094】

図4の概略図には、コントロール被験者、前臨床疾患ステージにあるアルツハイマー病患者、およびアルツハイマー病の初期臨床ステージにあるアルツハイマー病患者のヒト大脳組織中の、APP-C末端-C17抗体を用いて検出されるAPP-C末端断片の2Dプロファイルを重ねて示す。健常ならびに罹患組織中の両方で観察される、該スポット、すなわち、様々な2-D等電点変異体は、白抜き丸で示されている。健常組織に特異的なスポットは、斜線入りの丸で、アルツハイマー化組織に特異的なスポットは、黒丸で示される。

【0095】

アルツハイマー病中に改変を受けた、スポットの分子量および等電点の値を表1に示す。

【0096】

ネズミ大脳組織の1-D分析

ヒトAPPの異化および/または代謝の特異性をより明らかにするために、ラット、非トランスジェニック・マウス、ならびに、野生型ヒトAPP遺伝子(APP^{wt})またはスウェーデン型変異を有する遺伝子(APP^{sw})によるトランスジェニック・マウスにおいて、APP-C末端産物を(ヒト大脳組織と同様のやり方で)分析した。ヒト大脳組織のプロファイル(図5A、レーン4)と比較して、コントロールおよびトランスジェニック・マウスのAPP-C末端断片の免疫マーキングを、図5Aに示す。

【0097】

大脳組織ホモジネートの同スポット量を、各電気泳動ウェル中に導入した。A P P - C 末端断片を、A P P - C 末端 - C 1 7 ポリクローナル抗体を用いて検出した。図 5 のレーン 1 は、トランスフェクトされていないマウス（負のコントロール）の分析結果に対応し、レーン 2 は、A P P w t ヒト遺伝子の単一コピーを有するマウスに対応し、レーン 3 は、A P P s w ヒト変異遺伝子を有するトランスジェニック・マウスに対応し、レーン 4 は、コントロールのヒト大脳組織に対応する。矢印は、検出された電気泳動バンドの分子量を示す。

【 0 0 9 8 】

コントロールのマウスまたは A P P w t 遺伝子の単一コピーを有するものは、基本的に 4 個の A P P - C 末端断片を産生し、一方、A P P s w 遺伝子を有するマウスおよび正常ヒト大脳組織は、1 4 . 5、1 3 . 5、1 2、1 0 . 5、および 9 . 5 k D a の分子量を有する 5 個の A P P - C 末端断片を産生することが注目される。

10

【 0 0 9 9 】

これらの結果は、5 匹の非トランスジェニック・マウス、野生型ヒト A P P 遺伝子を有する 2 匹のトランスジェニック・マウス、および A P P s w 遺伝子を有する 5 匹のトランスジェニック・マウスで検証された。

【 0 1 0 0 】

図 5 B のレーン 1 ~ 3 は、A P P - C 末端 - C 1 7 抗体を用いた、様々な A P P s w トランスジェニック・マウス系統の免疫プロットの結果を示し（図 5、レーン 1 ~ 3）、その中には、H s i a o 等（8）によって記述されたリファレンスの A P P s w 系統（レーン 3）が示される。従って、該 A P P s w トランスジェニック・マウスは、本明細書に記載されるように、特定のプロファイルを体系的に有している。

20

【 0 1 0 1 】

マウス大脳組織の A P P - C 末端断片の 2 - D 分析

ヒト大脳組織に対して、上で記載した（図 4）と同様の操作を実施する。従って、コントロール・マウス（図 6 A）、A P P w t マウス（図 6 B）、ならびに A P P s w マウス（図 6 c）において観察される、様々な変異体を特徴づけることが可能である。A P P s w マウスにおける変異体の発現に亢進が認められ、また、特定の変異体においては、プロファイルの変異が認められる（図 6）。これらの分子量および等電点の値は、図 7 A および表 3 に示す。

30

【 0 1 0 2 】

細胞モデルにおけるヒト A P P の改変の 1 - D 分析

- 非神経モデル

野生型ヒト A P P 遺伝子（A P P w t）または A P P s w 遺伝子を安定した形でトランスフェクトした C H O（チャイニーズハムスター卵巣）細胞を、上述のプロトコルに従って分析した。図 8 の結果は、A P P w t または A P P s w 遺伝子によるトランスジェニック・マウス由来の大脳組織と比較して、C H O 細胞の A P P - C 末端断片を示す。

【 0 1 0 3 】

A P P w t C H O 細胞（図 8、レーン 3）では、見掛けの分子量 1 6、1 4 . 5、1 3 . 5、1 2、1 0 . 5、および 9 . 5 k D a の 6 本のバンドが検出される。主要なバンドは、1 6、1 4 . 5、1 3 . 5、および 9 . 5 k D a のバンドである。A P P s w C H O 細胞（図 8、レーン 4）では、シグナル全体、特に 1 6、1 3 . 5、および 9 . 5 k D a 断片で減少が観測される。

40

【 0 1 0 4 】

A P P w t（レーン 1）および A P P s w（レーン 2）トランスジェニック・マウスの大脳組織のホモジネートとの比較は、C H O 細胞中において検出されるバンドは、1 6 k D a のバンドを除き、該大脳組織のバンドと共通していることが示す。

【 0 1 0 5 】

C C F、U 1 1 8、および T 9 グリア細胞系統は、1 3 . 5、1 2、1 0 . 5、9 . 5、9、および 8 . 5 k D a の 6 本のバンドを具えるプロファイルを有し、9 . 5 から 8 . 5

50

kDaまでの3本のバンドが強いことが認められる(図8B)。同様なプロファイルは、HeLa、COS、およびAPPswでトランスフェクトされたSY-5Y細胞系統で観測されている(図8B)。

【0106】

その他、HT-29上皮細胞系統は、14.5、13.5、12、10.5、9.5および9kDaの6本のバンドのプロファイルを有する(図8:HT-29)。該9kDaのバンドは、HT-29上皮細胞では分離しており、グリコシル化ならびにグリコシル化タンパク質の配向を阻害するベンジル-O-GalNacで処理した後に、より強くなる。これは、グリコシル化が、APP-C末端の発現およびプロファイルを制御している、翻訳後修飾であることを示唆する。従って、この修飾は、アルツハイマー化中のAPP-C末端分子の病的な変異の研究において、考慮すべき重要な要素である。

10

【0107】

- 神経モデル

非トランスフェクト細胞と対比させて、APPsw、APPwt、変異PS1、およびタウ遺伝子を安定した形でトランスフェクトしたヒト神経芽細胞腫細胞(SKNSH-SY5Y)を分析した。結果を図9に示す。非トランスフェクト細胞では、APP-C末端シグナルは、10.5kDaバンドに対応する(図9:未変性)。一方、13.5、12、10.5、9.5、9、および8.5kDaの6個の断片が、APPswでトランスフェクトした未分化(non-differentiated)SKNSH細胞中で全て同定されている(図9:APPsw)。6本のバンドのプロファイルは、APPwtをトランスフェクトした細胞にも見られる(図9:野生型)。変異PS1遺伝子のSY5Y細胞へのトランスフェクトは、5本のバンドの増大、その際、強い9.5kDaのバンドが増大し、セクレターゼの作用によって遊離される、6.5kDa断片の増加を誘起する。

20

【0108】

Kelly細胞、さらには変異APPまたはPS1遺伝子をトランスフェクトしたSKNSH細胞、NT2細胞、hNT細胞などの、他の未変性神経細胞系も、未変性SKNSHタイプのプロファイルを有する。

【0109】

SY5Y細胞を14日にわたり分化させると、6.5kDaのバンドの出現と、10.5kDaのバンドの減少を伴う、プロファイルの変化が誘起される。同一条件下で、3Rタウ遺伝子をトランスフェクトした細胞および未分化細胞では、「セクレターゼ」断片の遊離が増大するのに対応して、13.5kDaバンドが出現する。これらの分化細胞では、6.5kDaのバンドの消失が観測される。

30

【0110】

これは、遺伝子が、APP-C末端断片の発現および相対的分布を変化させることが可能であることを示している。従って、これらのモデルは、ヒト大脳組織において観察されるように、APP-C末端断片の病的な変化のモデルとなる可能性を有している。

【0111】

ヒト白血球APP-C末端断片の分析

ヒト白血球のペレットを、(医薬または病院の)分析室において利用される標準プロトコルに従って調製した。このペレットを、上述と同様に処理し、APP-C末端-C17抗体を用いた免疫プロット法によって分析した。この結果は、図10Aに示し。レーン1~5はコントロールに対応し、レーン6~11はアルツハイマー病に罹患した患者由来の試料に対応する。性別と年齢を示す(図10A:性別、年齢)。

40

【0112】

APP-C末端-C17抗体は、分子量14kDa、10.5kDa、および9.5kDaの3個の断片を検出する。

【0113】

コントロール被験者およびアルツハイマー病と診断された患者由来の白血球の対比1-D分析は、(ヒト大脳組織の研究と同様に)コントロール被験者の白血球(レーン1~5)

50

と比較して、患者の白血球中におけるAPP - C末端断片の減少（レーン6～11）を立証することを可能とする。

【0114】

白血球のAPP - C末端断片の変異体は、2 - Dでも分析された（図10B）。検出された各スポットの分子量と等電点の値を図7Cおよび表2に示す。

【0115】

様々な免疫プローブ (immunological probes) を用いたAPP - C末端断片の特定

AペプチドのN末端に対する抗体は、セクレターゼの切断断片の位置特を可能とする。それは、FCA18抗体である（4）。白血球の14kDa断片は、この抗体によって検出され、それが、セクレターゼによって作製されるAPP - C末端断片であることを示唆している（図11B）。大脳組織においては、2本のバンドA（14.5kDa）とB（13.5kDa）は、Aペプチドの5～11部分に対するモノクローナル抗体（Abeta、GmbH、ハイデルベルク、ドイツ）である、WO2によって認識され、また、バンドBは、FCA18によって検出される。このことは、バンドAおよびBが、セクレターゼ領域の濃度に応じた、切断によって産生されることを示している（図1参照）。さらに、データベース調査（例えば、SwissProt）から、分子量9.5kDa（図11）、等電点6.99のAPP - C末端断片は、図1に示すように、セクレターゼ断片に相当することが示される。従って、アルツハイマー病に伴い、改変を受ける、白血球のこの2つの主要なAPP - C末端断片が同定された（図11、AおよびB）。

【0116】

また、5個の断片A～Cに共通な特定部位は、特異的な改変を受ける場合がある。従って、例えば、リン酸化トレオニン668を特異的に認識するポリクローナル抗体は、バンドA、C、およびDを選択的に認識する。本明細書に記載されている方法により、変性過程に関連している、翻訳後修飾を特定することが可能になる。従って、それは、APP - C末端断片の病的な変異に対する診断キットを有利にもたらし、新たな免疫ツールの開発を可能とするものである。

【0117】

APP - C末端断片のリン酸化は、その病的な変異における決定要素である。

【0118】

APP - C末端の代謝およびリン酸化の改変が、アルツハイマー病で起こる。コントロール被験者およびアルツハイマー病患者の大脳組織のAPP - C末端を、APP - C末端 - C17抗体を用いて免疫沈降させると、14.5、13.5、12、10.5、および9.5kDa（断片A、B、C、D、およびE）の5個の断片が、トリス - トリシングル中で同一抗体を用いた電気泳動後に見出される（図13、レーン1および2）。この免疫沈降APP - C末端断片を、子ウシ腸アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化し（図13、レーン3および4）、次いで、同じプロトコルに従ってAPP - C末端 - C17抗体を用いて検出した。13.5、10.5、および9.5kDaの、3個の主要な断片が、コントロールのホモジネート中に検出される。これら3個の断片は、アルツハイマーのホモジネート中でも検出される。しかし、この13.5kDa断片の量は少量で、一方、10.5および9.5kDa断片は多量である。この結果は、セクレターゼ切断による、これらの断片の蓄積と、それに、それらのより高いリン酸化を示している。

【0119】

リン酸化指数の変化は、特に、抗リン酸化トレオニン668抗体を用いて実証される（図13、レーン5および6）。トレオニン668上のリン酸化されたAPP - C末端断片は、トリス - トリシングル中での電気泳動後、APP - C末端 - C17抗体を用いて免疫沈降し検出される。14.5、12、および10.5断片がコントロールのホモジネート中に検出される。アルツハイマーのホモジネート中では、多量に検出されるのは実質的に12.5および10.5の断片である。この結果が、APP - C末端断片CおよびDがよりリン酸化され、かつアルツハイマー病の初期段階で多量にリン酸化され、同時に、断片

10

20

30

40

50

Aは、668部位で全くまたはほんの僅かしかリン酸化されないことを確認する。

【0120】

要点のまとめ

本発明の実施の上で、特に情報価値のある変異体を、表にまとめて示す(図14~16)。これら様々な変異体は、神経組織中、ならびに非神経組織、特に、リンパ球中の双方における、APPの病的な変異を検出するための極めて有用なマーカーを構成する。

【0121】

APP-C末端断片のトレオニン、セリン、チロシン上のリン酸化(図1)は、APP-C末端の全般的なプロファイルに寄与する。まず、特に、リン酸化トレオニン668によって示されるように、これら様々なAPP-C末端断片のリン酸化指数に違いが観測される(図11および13)。次いで、脱リン酸化APP-C末端断片のプロファイルが変化し、特に、14.5kDaバンドが消失し、従って、その新たなプロファイルは、APPswをトランスフェクトしたSKNSH細胞モデルのそれとに類似している(図13)。

10

【0122】

さらに、APP-C末端断片の脱リン酸化は、特に、APP-C末端断片のセクレターゼ切断産物に対応する、バンドC、D、Eの蓄積(図13)を伴う正常組織とアルツハイマー組織との間のプロファイル変化を説明する。従って、脱リン酸化は、重要な翻訳後の現象であり、APP-C末端断片の病的な変異のマーカーである。

【0123】

この変化は、その細胞モデルによって示されるように(図9)、アルツハイマー病に関する遺伝子によってその発現が変化を受ける、6.5kDaのセクレターゼ断片においても反映される。

20

【0124】

APP-C末端断片の検出は、ヒト神経組織(図12A:ヒト大脳組織)またはヒト非神経組織(図12B:ヒトリンパ球)、ならびに実験動物(図12C:APPswおよびAPPwtトランスジェニック・マウス由来の大脳組織)、または細胞、神経(図12D:神経芽細胞腫細胞)、または非神経(CHO細胞、COSなど)のモデルに適用可能な、病的変異の指標の定義を可能とする。この指標は、0(健常組織)から100%(アルツハイマー化病的組織)まで変化する(図12)。

30

参考文献

1. De Strooper B, Konig G (1999) Alzheimer's disease. A firm base for drug development [news] [comment]. *Nature*, 402, 471-2.
2. Sigurdsson EM, Permanne B, Soto C, Wisniewski T, Frangione B (2000) In vivo reversal of amyloid-beta lesions in rat brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59, 11-7.
3. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400:173-7.
4. Ancolio K, Dumanchin C, Barelli H, Warter JM, Brice A, Campion D, et al. (1999) Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96, 4119-24.
5. Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33, 988-91.
6. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, et al. (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzhei

40

50

mer's disease, *Neurology*, 52, 1158-65.

7. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, et al. (1996) Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383, 710-3.

8. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274, 99-102.

9. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

10. Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166, 368-79.

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 APP-C末端断片の切断を概念的に示す図と、利用した抗体のエピトープの位置を示す図である。

【図2】 ヒト大脳組織の(1-D)ウェスタン・プロットの結果(図2(A)と図2(B))と、APP-C末端断片のアッセイ結果(図2(C)と図2(D))を示す写真である。

【図3】 ヒト大脳組織分画のウェスタン・プロットの結果(図3(A)と図3(B))を示す写真である。

20

【図4】 ヒト大脳組織の(2-D)ウェスタン・プロットの結果(図4(A)~図4(C))を示す写真である。

【図5】 トランスジェニック・マウス大脳組織の(1-D)ウェスタン・プロットの結果(図5(A)と図5(B))を示す写真である。

【図6】 マウス大脳組織の(2-D)ウェスタン・プロットの結果を示す写真である。

【図7】 マウス大脳組織中(図7(A))、ヒト大脳組織中(図7(B))、ならびにヒトリンパ球中(図7(C))のAPP-C末端断片の2-Dプロファイルを合成した結果を示す図である。

【図8】 WTおよびSWマウスの大脳組織、APPwtおよびAPPswを有する非神経細胞系統のウェスタン・プロットの結果を示す写真である。

30

【図9】 APPwt、APPsw、変異PS1、3Rタウ、または4Rタウをトランスフェクトした、またはトランスフェクトしていない神経型細胞系統と、ヒト大脳組織とを比較したウェスタン・プロットの結果を示す写真である。

【図10】 ヒトリンパ球の1-D分析結果(図10(A))と2-D分析結果(図10(B))を示す図である。

【図11】 抗A-N末端抗体、APP-C末端抗体、およびリン依存性APP-C末端抗体によるAPP-C末端断片の同定の結果を示す図である。

【図12】 病的な変性のインデックスを示す図である。

【図13】 APP-C末端の病的な変性体に対するリン酸化の影響を示す図である。

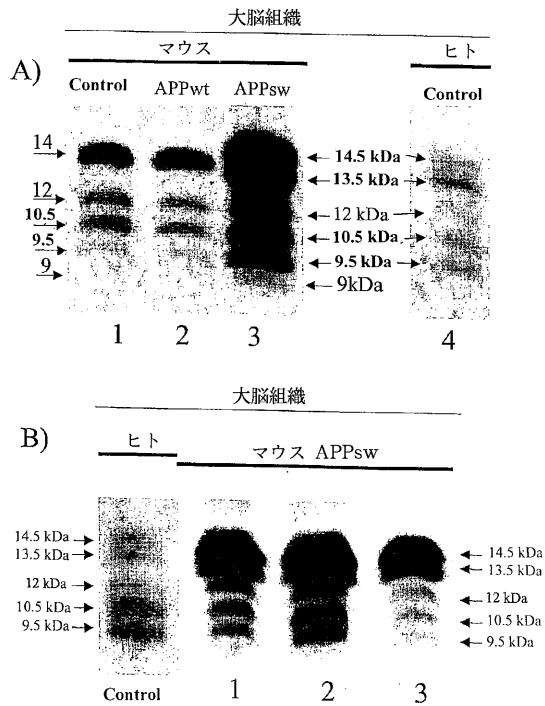
40

【図14】 本発明にかかる変異体の一覧表を示す。

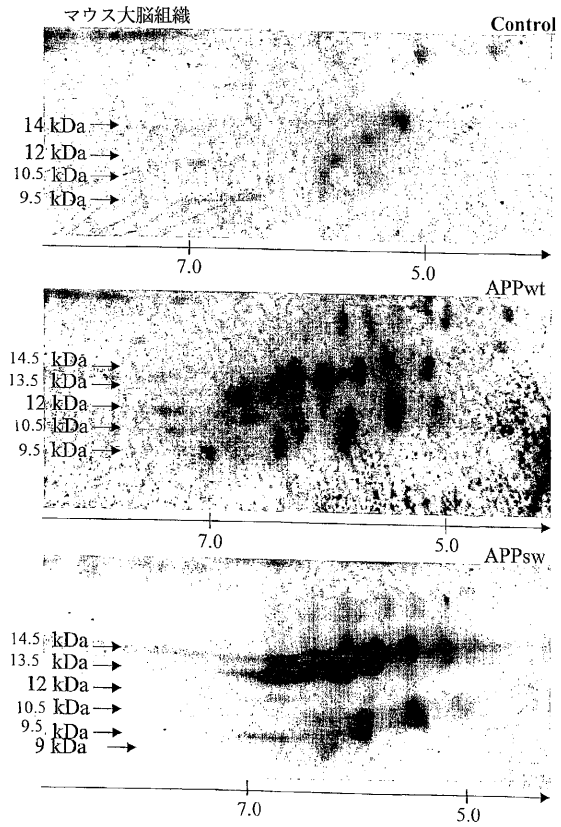
【図15】 本発明にかかる変異体の一覧表を示す。

【図16】 本発明にかかる変異体の一覧表を示す。

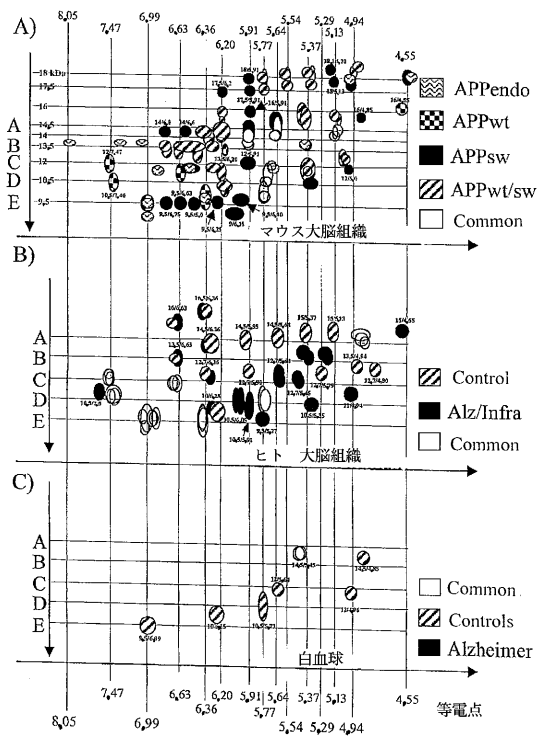
【 図 5 】



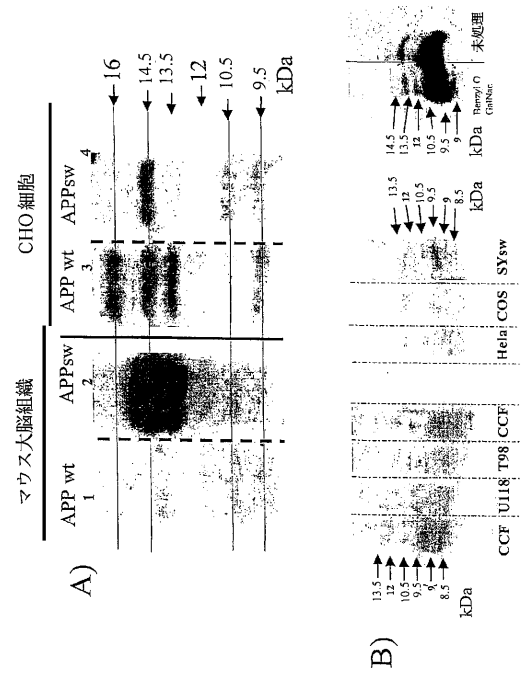
【 図 6 】



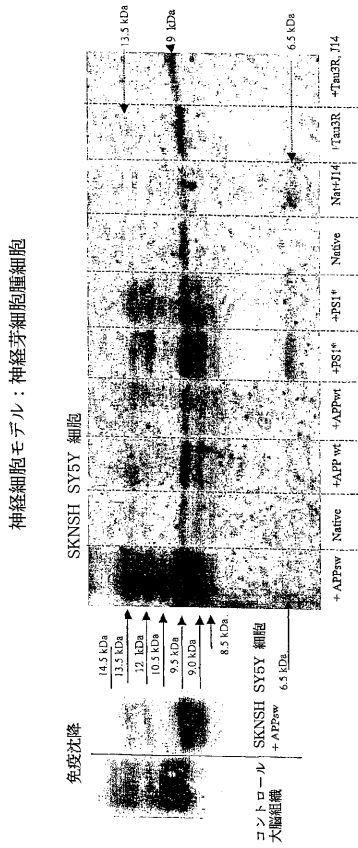
【 図 7 】



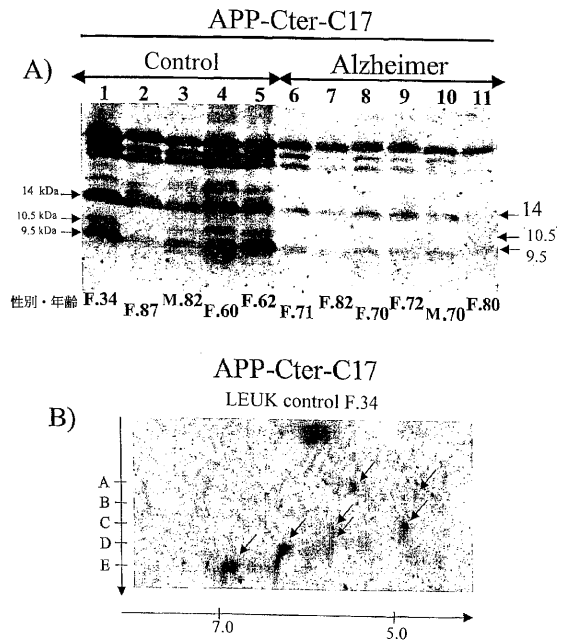
【 図 8 】



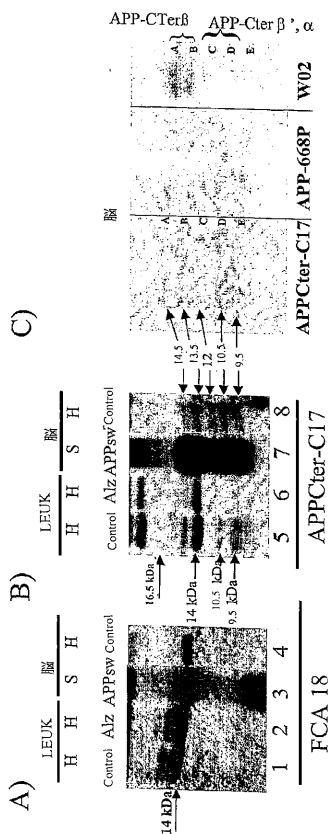
【 図 9 】



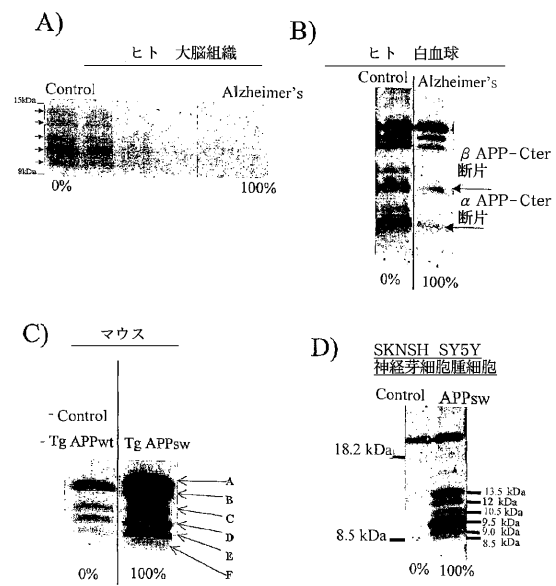
【 図 10 】



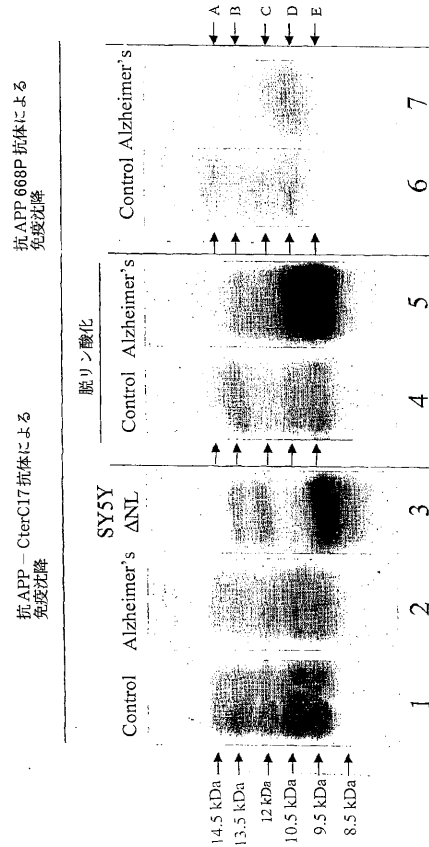
【 図 11 】



【 図 12 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

アルツハイマー病において消失する APP-Cter 断片					
APP-Cter	分子量	等電点			
A	15.0 kDa			5.37	5.13
	14.5 kDa	5.95	5.64		
B	13.5 kDa			4.94	4.80
	12.7 kDa	5.90	5.29		
アルツハイマー病に特異的な APP-Cter 断片					
APP-Cter	分子量	等電点			
D	11.0 kDa				4.94
	10.5 kDa	7.5		5.35	
E	9.5 kDa		5.77		
アルツハイマー病の前臨床段階ならびにアルツハイマー病と共通する APP-Cter 断片					
APP-Cter	分子量	等電点			
A	15 kDa				4.55
B	14.0 kDa			5.37	5.2
C	12.7 kDa		5.64	5.45	
D	10.5 kDa	6.05	5.91		

【 図 1 5 】

コントロールのヒト白血球の APP-Cter 断片					
APP-Cter	分子量	等電点			
A	14 kDa			5.45	4.85
C	12.0 kDa		5.64		4.96
D	10.5 kDa		5.77		
	10 kDa	6.25			
E	9.5 kDa	6.99			
アルツハイマー病のヒト白血球の APP-Cter 断片					
APP-Cter	分子量	等電点			
A	14.5 kDa			5.45	

【 図 1 6 】

内因性の APP-Cter 断片と相違する、トランスジェニック・マウスの APP-Cter 断片							
APP-Cter	分子量	等電点					
A	18 kDa	5.91	5.77	5.54	5.37	5.20	5.13
	17.5 kDa	6.20	5.91				
	16 kDa	6.20	5.91	5.64	5.37	5.13	4.55
	14.5 kDa		6.80	6.60	6.36	6.20	5.91
B	13.5 kDa					6.36	6.20
	13.0 kDa	6.70	6.63	6.40	6.27	6.15	5.10
C	12.0 kDa		7.50	6.20	5.91	5.37	5.00
D	10.5 kDa					7.40	5.37
E	9.5 kDa	6.75	6.63	6.50	6.25	6.15	6.00

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 33/50 T
 G 0 1 N 33/50 Z
 G 0 1 N 33/577 B

(74)復代理人 100129735

弁理士 太田 顕学

(74)代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72)発明者 ドラクールト、 アンドレ

フランス国 エフ - 5 9 1 5 5 ファシェ テュメニ ル ガンベタ 7 5

(72)発明者 セルジュアン、 ニコラ

フランス国 エフ - 5 9 7 9 0 ロンシアン ル ジャン ジョーレ 9

(72)発明者 ヴァニユクシーム、 ドロテ

フランス国 エフ - 5 9 3 1 0 ランベルサル ル ガブリエル ブヴェル 2 4 ビス

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特表平09 - 508196 (J P , A)

特開平04 - 505865 (J P , A)

特開平07 - 051096 (J P , A)

特表平04 - 505865 (J P , A)

特開平10 - 001499 (J P , A)

特表2000 - 516087 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48-33/98

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

G01N 27/447

G01N 33/15

专利名称(译)	检测APP蛋白病理变性的方法及其用途		
公开(公告)号	JP4294953B2	公开(公告)日	2009-07-15
申请号	JP2002539821	申请日	2001-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	国家健康科学研究所		
申请(专利权)人(译)	国家研究所德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (B , NA , ES中.D.啤酒 , EM) .		
当前申请(专利权)人(译)	国家研究所德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (B , NA , ES中.D.啤酒 , EM) .		
[标]发明人	ドラクールトアンドレ セルジュアンニコラ ヴァニユクシームドロテ		
发明人	ドラクールト、 アンドレ セルジュアン、 ニコラ ヴァニユクシーム、 ドロテ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/447 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2500/00 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/53.D G01N27/26.315.H G01N27/26.315.F G01N27/26.301.A G01N33/15.Z G01N33/50.T G01N33/50.Z G01N33/577.B		
代理人(译)	宫崎昭雄 大田Arawagaku		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	2000014143 2000-11-03 FR		
其他公开文献	JP2004522940A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的特征尤其在于使用由APP的羧基末端部分的分解代谢和/或代谢片段组成的标记物，APP-C末端片段，其在病因学中经历了涉及APP的神经变性症状的修饰。用于检测分析物样品中APP蛋白的病理改变的方法。本发明在诸如阿尔茨海默氏病的退行性疾病中具有诊断和治疗应用。

