

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-508810
(P2007-508810A)

(43) 公表日 平成19年4月12日(2007.4.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z	4 B O 2 4
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	4 B O 5 0
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 64 頁) 最終頁に続く

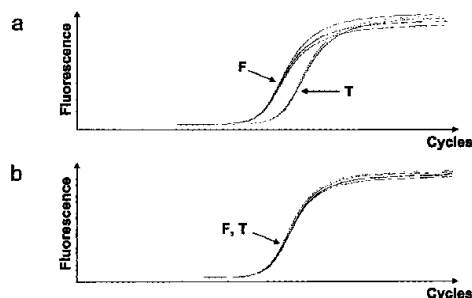
(21) 出願番号	特願2006-530259 (P2006-530259)	(71) 出願人	504087411 エヴォテック ニューロサイエンス ゲ ゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
(86) (22) 出願日	平成16年9月29日 (2004.9.29)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(85) 翻訳文提出日	平成18年5月26日 (2006.5.26)	(72) 発明者	フォン デル カンマー ハイッツ ドイツ連邦共和国 2 2 6 0 7 ハンブル ク ヴェルビンドウングスシュトラーセ 6 デー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/052353	(72) 発明者	ポールナー ヨハーネス ドイツ連邦共和国 2 2 1 7 5 ハンブル ク クヴァイテンヴェーク 1 1
(87) 国際公開番号	W02005/030947		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成17年4月7日 (2005.4.7)		
(31) 優先権主張番号	60/506,775		
(32) 優先日	平成15年9月30日 (2003.9.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 スルホトランスフェラーゼの神経変性疾患に関する診断的および治療的使用

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病患者の特定の脳領域における細胞質スルホトランスフェラーゼの発現の差を開示する。この知見に基づき、本発明は被験者において神経変性疾患、特にアルツハイマー病を診断または予測診断するための、または被験者がそのような疾患を発症する高いリスクがあるかどうかを判定する方法を提供する。さらに、本発明は、SULT4A1をコードする遺伝子を用いた、アルツハイマー病および関連する神経変性疾患を治療または予防するための治療的および予防的方法を提供する。神経変性疾患の調節物質についてのスクリーニング方法および組み換え動物モデルもまた開示される。

Verification of differential expression of SULT4A1 splice variant 1 and/or splice variant 2 by quantitative RT-PCR



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者において神経変性疾患を診断または予測診断する、または被験者が前記疾患を発症する高いリスクがあるかどうかを判定する、

前記被験者由来の試料中の

(i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の転写産物、および / または

(i i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または

(i i i) 前記転写または翻訳産物の断片、または誘導体、または変異体、
のレベルおよび / または活性を測定し、および前記レベルおよび / または前記活性を、既知の疾患または健康状態を表す参照値と比較し、それによって前記被験者において前記神経変性疾患を診断または予測診断すること、または前記被験者が前記神経変性疾患を発症する高いリスクがあるかどうかを判定すること

を含む方法。

【請求項 2】

前記神経変性疾患がアルツハイマー病である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 が細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 スプライス変異体 1 および / または細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 スプライス変異体 2 である、請求項 1 および 2 に記載の方法。

【請求項 4】

下記の段階 (i) および (i i) によって、被験者において神経変性疾患、特にアルツハイマー病を診断または予測診断する、または被験者のそのような疾患を発症する傾向または素因を判定するためのキットであって、

(i) 前記被験者に由来する試料中の、細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の転写産物および / または翻訳産物の、レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を検出、および (i i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の転写産物および / または翻訳産物の前記レベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を、既知の健康状態を表す参照値とおよび / または既知の疾患状態を表す参照値と比較し、および前記転写産物および / または前記翻訳産物の前記レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方が、既知の健康状態を表す参照値と比較して変化し、および / または既知の疾患状態を表す参照値と同様または等しい、

a) (i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の転写産物を選択的に検出する試薬および (i i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の翻訳産物を選択的に検出する試薬、から成る群から選択された少なくとも一つの試薬を含む前記キット。

【請求項 5】

(i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子、および / または

(i i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の転写産物、および / または

(i i i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または

(i v) (i) から (i i i) の断片、または誘導体、または変異体の活性および / またはレベルに直接的にまたは間接的に影響を及ぼす、治療的にまたは予防的に有効な量の一または複数の物質を被験者へ投与することを含む、被験者において神

10

20

30

40

50

経変性疾患、特にアルツハイマー病を治療または予防する方法。

【請求項 6】

細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1、またはその断片、または誘導体、または変異体をコードする非天然遺伝子配列を含む、遺伝子操作非ヒト動物。

【請求項 7】

非ヒト動物が、哺乳類、好ましくはげっ歯類、より好ましくはマウス、ラットまたはモルモット、または非脊椎動物、好ましくは昆虫、より好ましくはショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) といったハエである、請求項 6 に記載の遺伝子操作非ヒト動物。

【請求項 8】

前記遺伝子操作の発現が、神経変性疾患に類似した神経病理の症状、特に AD に類似した症状を発症する素因を示すおよび / または症状を示す前記非ヒト動物を結果として生じる、請求項 6 および 7 に記載の遺伝子操作非ヒト動物。

【請求項 9】

前記非ヒト動物を遺伝子操作するのに用いられた遺伝子の発現によって引き起こされた作用のために、前記遺伝子操作の発現が、神経変性疾患に類似した症状を発症するリスクが低い、特に AD に類似した症状を発症するリスクが低い、および / または AD 症状の低減を示すおよび / または AD の症状を有しない前記非ヒト動物を結果として生じる、請求項 6 および 7 に記載の遺伝子操作非ヒト動物。

【請求項 10】

神経変性疾患、特にアルツハイマー病を治療するための診断薬および治療薬の開発において、化合物、物質、および調節因子を、スクリーニング、試験、および評価するための、請求項 7 から 9 に記載の遺伝子操作非ヒト動物の使用。

【請求項 11】

神経変性疾患、特にアルツハイマー病、または関連する疾患または障害の調節因子についての、

(i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子、および / または

(i i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の転写産物、および / または

(i i i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または

(i v) (i) から (i i i) の断片、または誘導体、または変異体から成る群から選択された一種類以上の物質のスクリーニングのための測定法であって、

(a) 細胞を被験化合物と接触させること；

(b) (i) から (i v) で列挙された一種類以上の物質の、活性および / またはレベルを測定すること；

(c) 前記被験化合物と接触させていない対照細胞中の、(i) から (i v) で列挙された一種類以上の物質の、活性および / またはレベルを測定すること；および

(d) 段階 (b) および (c) の細胞中の物質のレベルおよび / または活性を比較すること (但し、接触させた細胞中の物質の活性および / またはレベルの変化は被験化合物が前記疾患または障害の調節因子であることを示す)

を含む前記方法。

【請求項 12】

神経変性疾患、特にアルツハイマー病、または関連する疾患または障害の調節因子についての、

(i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子、および / または

(i i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝

10

20

30

40

50

子の転写産物、および/または

(i i i) 細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または

(i v) (i) から (i i i) の断片、または誘導体、または変異体

から成る群から選択された一種類以上の物質のスクリーニングのための測定法であって、(a) (i) から (i v) で列挙された一種類以上の物質に関して、神経変性疾患または関連する疾患または障害の症状を発症する素因があるかまたは既に発症している被験動物に、被験化合物を投与すること；

(b) (i) から (i v) で列挙された一種類以上の物質の、活性および/またはレベルを測定すること；

(c) (i) から (i v) で列挙された一種類以上の物質に関して、およびそのような被験化合物が投与されていない、神経変性疾患または関連する疾患または障害の症状を発症する素因があるかまたは既に発症している対応する対照動物において、(i) または (i v) で列挙された一種類以上の物質の活性および/またはレベルを測定すること；

(d) 段階 (b) および (c) の動物における物質の活性および/またはレベルを比較すること (但し、被験動物における物質の活性および/またはレベルの変化は被験化合物が前記疾患または障害の調節因子であることを示す)

を含む前記方法。

【請求項 13】

前記被験動物および/または前記対照動物が、天然の細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 遺伝子転写調節配列ではない転写調節配列の調節下にある、細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子、またはその断片、または誘導体、または変異体を発現する遺伝子操作非ヒト動物である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

リガンドと、細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 タンパク質、またはその断片、または誘導体、または変異体との間の結合の阻害について、化合物を試験するための、好ましくは複数の化合物をスクリーニングするための測定法であって、

(i) 前記細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 タンパク質、またはその断片、または誘導体、または変異体の懸濁液を複数の容器に加える；

(i i) 結合の前記阻害についてスクリーニングする一または複数の化合物を前記複数の容器に加える；

(i i i) 検出可能なリガンド、特に蛍光検出可能なリガンドを前記容器に加える；

(i v) 前記細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 タンパク質、またはその前記断片、または誘導体、または変異体、および前記一または複数の化合物、および前記リガンドの懸濁液をインキュベートする；

(v) 前記細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 タンパク質に、またはその前記断片、または誘導体、または変異体に結合した、検出可能なリガンド、好ましくは蛍光の量を測定する；および

(v i) 前記リガンドの、前記細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 タンパク質、またはその前記断片、または誘導体、または変異体への結合の、一種類以上の前記化合物による阻害の程度を測定する

段階を含む前記測定法。

【請求項 15】

神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病を検出するための診断標的としての、細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、または誘導体、または変異体である、配列番号 1 および/または配列番号 2 のタンパク質分子の使用。

【請求項 16】

神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病を予防する、または治療する、または改善す

10

20

30

40

50

る試薬または化合物についてのスクリーニング標的としての使用のための、細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー4 Aメンバー1をコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、または誘導體、または変異体である、配列番号1および/または配列番号2のタンパク質分子の使用。

【請求項17】

被験者由来の試料中の細胞の病理状態を検出するための、免疫原と特異的に免疫反応性である抗体の使用であって、前記免疫原が、配列番号1および/または配列番号2の、細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー4 Aメンバー1をコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、または誘導體、または変異体であり、前記抗体を用いた前記細胞の免疫細胞化学染色を含み、ここで既知の健康状態を表す細胞と比較した前記細胞における染色の程度の変化、または染色パターンの変化が、神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病と関係する前記細胞の病理状態を示すものである、前記使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被験者における神経変性疾患の進行を診断、予測、および監視する方法に関する。さらに、神経変性疾患の調節物質の治療コントロールおよびスクリーニングの方法を提供する。本発明はまた、医薬組成物、キット、および組み換え動物モデルも開示する。

【0002】

神経変性疾患、特にアルツハイマー病 (AD) は、患者の生活を強く衰弱させる影響を与える。さらに、これらの疾患は、甚大な健康上の、社会的な、および経済的な負担を構成する。ADは最も一般的な神経変性疾患であり、痴呆の症例全体の約70%を占め、65歳超の人口の約10%および85歳超の最大45%が罹患する、おそらく最も破壊的な加齢関連神経変性症状である (最近の総説はヴィッカーズ (Vickers) ら、*Progress in Neurobiology* 2000, 60; 139-165を参照)。現在、これは米国、欧州、および日本において推定約1200万例に達する。この状況は、発展途上国における高齢者数の人口統計上の増加 (「ベビーブーマーの高齢化」) に伴い不可避免的に悪化する。ADを有する人の脳に生じる神経病理学的な顕著な特徴は、アミロイド - タンパク質で構成される老人斑、および異常な線維状構造の出現および神経原線維変化の形成と一致して現れる著しい細胞骨格変化である。

20

30

【0003】

アミロイド - (A) タンパク質は、さまざまな種類のプロテアーゼによるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の開裂から生じる。 / - セクレターゼによる開裂はさまざまな長さのAペプチドの形成に繋がり、典型的には、40アミノ酸から構成される短くより可溶性が高く凝集が遅いペプチド、および細胞外で迅速に凝集し特徴的なアミロイド斑を形成する、より長い42アミノ酸ペプチドである (セルコー (Selkoe), *Physiological Rev* 2001, 81; 741-66; グリーンフィールド (Greenfield) ら, *Frontiers Bioscience* 2000, 5; D72-83)。それらは主に大脳皮質および海馬に見出される。脳における毒性のA沈着物の生成は、ADの経過のごく早期に開始し、およびADの病理に繋がるその後の破壊過程の中心的存在であると論じられている。ADの他の病理学的な顕著な特徴は、神経原線維変化 (NFT) および、ニューロピル・スレッドと表現される異常な神経突起である (ブランク (Braak) およびブランク (Braak), *Acta Neuropathol* 1991, 82; 239-259)。NFTは神経細胞の内部に出現し、および互いに絡まり合う対のらせん状線維を形成する、化学的に変化したタウタンパク質から成る。神経原線維変化の出現およびその数の増加は、ADの臨床的重症度とよく相関する (シュミット (Schmitt) ら, *Neurology* 2000, 55; 370-376)。

40

【0004】

50

A Dは進行性疾患であり、初期の記憶形成の障害を伴い、および最終的にはより高次の認知機能の完全な衰退に繋がる。認知障害には、とりわけ、記憶障害、失語症、失認症、および実行機能の喪失がある。A Dの病因の特徴的性質は、脳の特定の領域および神経細胞の部分集団の、変性過程に対する選択的な不安定性である。具体的には、側頭葉領域および海馬は、疾患の経過中に早期におよびより重度に冒される。一方、前頭皮質、後頭皮質、および小脳内の神経細胞は大体は損なわれないうままであり、神経変性から守られている(テリー(Terry)ら, *Annals of Neurology* 1981, 10; 184-92)。A Dの発症年齢は50年の範囲内でさまざまであり、65歳未満の人で起こる早発型A D、65歳超の人で起こる遅発型A Dがある。A Dの全症例のうち約10%が早発型A Dに罹患し、1~2%だけが家族性の遺伝例である。

10

【0005】

現在、A Dに治療法は無く、A Dの進行を止めるか、または高確率で死亡前にA Dを診断するためさえ、有効な方法は無い。個人がA Dを発症する素因となるいくつかのリスク因子が特定されており、中でも非常に重要なのは、アポリポタンパク質E遺伝子(ApoE)の既存の3つの異なる対立遺伝子(イプシロン2、3、および4)のイプシロン4対立遺伝子である(シュトリトマター(Strittmatter)ら, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90; 1977-81; ローゼス(Roses), *Ann NY Acad Sci* 1998, 855; 738-43)。

【0006】

第21染色体上のアミロイド前駆体タンパク質(APP)、第14染色体上のプレセニリン-1、および第1染色体上のプレセニリン-2の遺伝子の遺伝的欠陥によるとされる早発型A Dの稀な例が存在するが、遅発型散発性A Dの一般的な型は、これまでのところ病因的起源は不明である。神経変性疾患の遅い発症および複雑な病因は、治療用および診断用薬の開発に困難な問題をもたらす。医薬標的および診断マーカーの候補のプールを拡大することが極めて重大である。したがって、神経疾患の病因に関する洞察を与えること、およびこれらの疾患の治療の診断および開発に特に適した方法、材料、物質、組成物、および動物モデルを提供することは、本発明の目的である。この目的は、独立請求項の条項によって解決される。下位請求項は、本発明の好ましい実施形態を定義する。

20

【0007】

本発明は、ヒトアルツハイマー病脳試料中の、細胞質スルホトランスフェラーゼをコードする遺伝子の発現の差およびそのタンパク質産物を基礎とする。スルホトランスフェラーゼはさまざまな医薬、生体異物および内因性分子の代謝において重要な役割を果たす(ファラニー(Falany), *FASEB J.* 1997, 11: 206-216)。それらは前記分子と、負に荷電したスルホン酸部分で結合することができ、それによって化合物の可溶性をより高める。このことは、修飾された物質の排泄の促進による解毒の改善に繋がる。加えて、硫酸化はその化合物の生物活性に影響しうる。三酸化硫黄スルホン酸をドナー3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸から転移することによって酵素的に結合したそれらの化合物には、たとえば甲状腺ホルモン、ドーパミン、ステロイドおよび神経伝達物質がある。

30

【0008】

スルホトランスフェラーゼのファミリーは二つの分類に再分割することができる。一方のファミリーは、主にゴルジに存在し、および、グリコサミノグリカン、糖タンパク質およびチロシン残基の硫酸化に関与することが記載されている膜結合酵素を含む。他方のファミリーは、ステロイド、モノアミン神経伝達物質、生体異物および医薬の修飾を担う細胞質酵素から成る。

40

【0009】

SULT4A1(ヒト(Homo sapiens)細胞質スルホトランスフェラーゼ、Genbank登録番号AF251263;別名BR-STL-1、Genbank登録番号AF188698;SULTX3、Genbank登録番号AF115311、および神経系細胞質スルホトランスフェラーゼ、NSTまたはSULTn、Genbank

50

登録番号AF176342)は、ヒト、マウス、およびラット脳ライブラリからクローニングされた(ファラニー(Falany)ら、Biochem. J. 2000, 346: 857-864; サカキバラ(Sakakibara)らGene 2002, 285: 39-47; 特許出願国際公開第02/18541号パンフレット)。ヒトの長さ855bpのオープン・リーディング・フレームは、計算分子量約33kDaを有する284アミノ酸をコードし、および、マウス(マウスSULT4A1、遺伝子ID: 29859、遺伝子座NT_039621)およびラットホモログ(Genbank登録番号O43728; ファラニー(Falany)ら、Biochem. J. 2000, 346: 857-864; サカキバラ(Sakakibara)らGene 2002, 285: 39-47)と98%配列同一性を共有する。SULT4A1は染色体22q13にマッピングされ、7個のエクソンから成り、およびゲノムDNAの計47kbpの範囲にわたる(国際公開第02/18541号パンフレット)。バイオインフォマティクス分析は、少なくとも三種類のスプライス変異体が存在することを明らかにした。第一のスプライス変異体は、以後SULT4A1sv1とも呼ぶが、SULT4A1(Genbank登録番号AF176342)の上記の配列と同一である。第二のスプライス変異体は、以後SULT4A1sv2と称するが、Genbank登録番号AF176342(SULT4A1sv1)のヌクレオチド190~528にわたる二個のエクソンを欠き、結果として171アミノ酸をコードする516ヌクレオチドのオープン・リーディング・フレームを生じる。第三のスプライス変異体は、ヌクレオチド190~320に位置する一個のエクソンの欠損によって異なり、これはC末端で変化したオープン・リーディング・フレームを結果として生じうると考えられる。

【0010】

多数の一塩基多型がSULT4A1遺伝子の領域にマッピングされている(イイダ(Iida)ら、J. Hum. Genet. 2001, 46: 225-240)。SULT4A1は、スルホトランスフェラーゼファミリーの硫酸・ドナー基質の結合に参与することが示されている領域および触媒活性部位において30%を超える配列同一性を共有しており、他のヒトスルホトランスフェラーゼとの配列類似性のため、スルホトランスフェラーゼが割り当てられている(ファラニー(Falany)ら、Biochem. J. 2000, 346: 857-864)。

【0011】

ノーザンブロット分析は、本タンパク質が主に脳組織で発現されており、最も高い発現レベルは皮質領域に見出されることを明らかにした(ファラニー(Falany)ら、Biochem. J. 2000, 346: 857-864; サカキバラ(Sakakibara)ら、Gene 2002, 285: 39-47)。二つの研究グループは、さまざまなよく知られたスルホトランスフェラーゼ基質に対する酵素活性を実証することができず、したがってSULT4A1は非常に選択性の高い基質を有しうるかまたは多酵素複合体中で活性でありうることを示唆した(ファラニー(Falany)ら、Biochem. J. 2000, 346: 857-864; アドジェイ(Adjey)およびワインシルボウム(Weinshilbourn), Biochem. Biophys. Res. Comm. 2002, 292: 402-408)。しかし、サカキバラらは、ヒトおよびマウスSULT4A1タンパク質は共にL-トリヨードチロニン、チロキシン、エストロン、p-ニトロフェノール2-ナフチルアミン、および2-ナフトールのような内因性および生体異物化合物に対して活性であることを実証した(サカキバラ(Sakakibara)ら、Gene 2002, 285: 39-47)。

【0012】

本発明では、偏りがなくおよび感受性の高いディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて、SULT4A1のスプライス変異体(アイソフォーム)をコードする遺伝子の転写産物がヒト脳試料中に検出される。下側頭葉、内側嗅皮質、海馬、および小脳扁桃内の神経細胞がADにおける変性過程を受ける(テリー(Terry)ら、Annals of Neurology 1981, 10: 184-192)。これらの脳領域は、主に学習

および記憶機能の処理に関与し、およびADにおける神経損失および変性に対して選択的な静寂性を示す。対照的に、前頭皮質、後頭皮質、および小脳内の神経細胞は概ね損なわれず、および神経変性過程から守られたままである。AD患者および年齢の対応する対照健常者の前頭皮質(F)、側頭皮質(T)、および海馬(H)に由来する脳組織を、本明細書で開示する実施例に用いた。重要なことに、本発明はAD患者から採取された脳試料の下側頭葉で、または海馬で、前頭皮質試料と相対的なSULT4A1転写産物の検出、および調節の差、調節障害を開示する。そのような調節障害は、年齢の対応する対照健常者から得られた試料では観察されない。現在まで、SULT4A1遺伝子発現の調節障害と、神経変性疾患、特にADの病院との間の関係を実証した実験は記載されていない。SULT4A1遺伝子およびコードされたSULT4A1タンパク質の、そのような疾患との関連は、本発明で開示される通り、前記疾患、特にADの、特に診断および治療のための新しい方法を提供する。

10

【0013】

ここでおよび請求項で用いられる単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈でそうでないと示されない限り、複数への言及を含む。たとえば、「a細胞(一つの細胞)」は複数の細胞をも意味する、など。本明細書および請求項で用いられる「および/または」の語句は、この語句の前および後の語句が選択肢としてまたは組み合わせて考えられるべきであることを示す。たとえば、「レベルおよび/または活性の測定」という言い回しは、レベルだけ、または活性だけ、またはレベルおよび活性の両方が測定されることを意味する。ここで用いられる「レベル」の語は、転写産物、たとえばmRNA、または翻訳産物、たとえばタンパク質またはポリペプチドの、量または濃度の尺度または指標を含むことを意図する。ここで用いられる「活性」の語は、転写産物または翻訳産物が生物学的効果を生じる能力についての指標、または、生物学的に活性な分子のレベルの指標と理解すべきである。「活性」の語はまた、酵素活性を、または、結合、拮抗、抑制、阻害または中和をいう生物活性および/または薬理活性をいう。ここで用いられる「レベル」および/または「活性」の語はさらに、遺伝子発現レベルまたは遺伝子活性をいう。遺伝子発現は、遺伝子産物の産生に繋がる、転写および翻訳による、遺伝子に含まれる情報の利用と定義される。「調節障害」は遺伝子発現のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを意味することとする。遺伝子産物はRNAまたはタンパク質のどちらかを含み、および遺伝子の発現の結果である。遺伝子産物の量は、遺伝子がどの程度活性であるかを測定するのに用いることができる。本明細書および請求項で用いられる「遺伝子」の語は、コード領域(エクソン)および非コード領域(たとえばプロモーターまたはエンハンサー、イントロン、リーダーおよびトレーラー配列といった非コード調節配列)の両方を含む。「ORF」の語は「オープン・リーディング・フレーム」の頭文字であり、および、少なくとも1つの読み枠に終止コドンを持たずおよびしたがって潜在的にアミノ酸の配列に翻訳されうる核酸配列をいう。「調節配列」は、遺伝子発現を推進し調節する、誘導性および非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター、およびその他の配列を含む。ここで用いられる「断片」の語は、たとえば択一的にスプライシングされ、または短縮され、またはさもなければ切断された転写産物または翻訳産物を含むことを意図する。ここで用いられる「誘導体」の語は、突然変異の、またはRNA改変された、または化学的に修飾された、または別の方法で改変を受けた転写産物、または、突然変異の、または化学的に修飾された、または別の方法で改変を受けた翻訳産物をいう。明確には、誘導体転写産物は、たとえば、一塩基または複数塩基の欠失、挿入、または交換といった変化を核酸配列に有する転写産物をいう。「誘導体」は、変化したリン酸化、またはグリコシル化、またはアセチル化、または脂質化といった過程によって、または変化したシグナルペプチド開裂またはその他の型の成熟開裂によって生じうる。これらの過程は翻訳後に起こりうる。本発明および請求項で用いられる「調節因子」の語は、遺伝子、または遺伝子の転写産物、または遺伝子の翻訳産物のレベルおよび/または活性を変化または改変することができる分子をいう。好ましくは、「調節因子」は、遺伝子の転写産物または翻訳産物の生物学的活性を変化または改変することができる。前記の調節は、たとえば、生

20

30

40

50

物活性および/または薬理活性、酵素活性の上昇または低下、結合特性の変化、または遺伝子の前記翻訳産物の生物学的、機能的、または免疫学的性質の何らかのその他の変化または改変でありうる。「調節因子」は、イオンチャンネルサブユニットまたはイオンチャンネルの機能的性質を促進または阻害、したがって「調節する」、イオンチャンネルまたはイオンチャンネルサブユニットの結合、拮抗、抑制、阻害、中和または封鎖を「調節する」、および活性化、作用、アップレギュレーションを「調節する」ことができる能力を有する分子をいう。「調節」はまた、細胞の生物活性に影響を与える能力をいうのにも用いられる。「調節因子」、「物質」、「試薬」、または「化合物」の語は、細胞、組織、体液に対して、または任意の生物学的系または被験分析系の背景内で、正または負の生物学的効果を有する任意の物質、化学物質、組成物または抽出物をいう。それらは標的の作用因子、拮抗因子、部分的な作用因子または逆作用因子でありうる。それらは、核酸、天然または合成ペプチドまたはタンパク質複合体、または融合タンパク質でありうる。それらはまた、抗体、有機または無機分子または組成物、低分子、薬物、および上の前記物質のうち任意のものの任意の組み合わせでありうる。それらは診断のまたは治療の目的のための試験に用いることができる。そのような調節因子、物質、試薬または化合物は、細胞培地、または細胞培養に用いられる血清中に存在する因子、栄養因子といった因子でありうる。本発明で用いられる「栄養因子」は、神経栄養因子を、サイトカインを、ニューロカインを、神経免疫因子を、脳由来因子(BDNF)を、およびTGFベータファミリーの因子を含むがそれらに限定されない。そのような栄養因子の例は、ニューロトロフィン3(NT-3)、ニューロトロフィン4/5(NT-4/5)、神経成長因子(NGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)、上皮成長因子(EGF)、インターロイキン-ベータ、膠細胞由来神経栄養因子(GDNF)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、インシュリン様成長因子(IGF)、形質転換成長因子(TGF)および血小板由来成長因子(PDGF)である。「オリゴヌクレオチドプライマー」または「プライマー」の語は、相補的塩基対のハイブリダイゼーションによって、与えられた標的ポリヌクレオチドとアニーリングすることができ、およびポリメラーゼによって伸長することができる、短い核酸配列をいう。それらは特定の配列に対して特異的であるように選択することができ、または任意に選択することができ、たとえばそれらはある混合物中のすべての可能な配列のプライマーとなることができる。ここで用いられるプライマーの長さは10ヌクレオチドから80ヌクレオチドまで変動しうる。「プローブ」はここで記載および開示される核酸配列の短い核酸配列またはそれと相補的である配列である。それらは完全長配列、または任意の配列の断片、誘導體、アイソフォーム、または変異体を含むことができる。「プローブ」と分析試料との間のハイブリダイゼーション複合体の同定は、その試料内の他の類似配列の存在の検出を可能にする。ここで用いられる「ホモログまたはホモロジー」は、ヌクレオチドまたはペプチド配列の、別のもう一つのヌクレオチドまたはペプチド配列との関連性を表す本分野の語であり、比較される前記配列間の同一性および/または類似性の程度によって測定される。本分野では、「同一性」および「類似性」の語は、問い合わせ配列と、好ましくは同一の種類別の配列(核酸またはタンパク質配列)とを、互いにマッチングさせることによって決定される、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列関連性の程度を意味する。「同一性」および「類似性」を計算および決定するための好ましいコンピュータプログラム法は、GCG BLAST(基礎局所整列検索ツール(Basic Local Alignment Search Tool))(アルチュール(Altshul)ら, J. Mol. Biol. 1990, 215: 403-410; アルチュールら, Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3389-3402; デベロー(Devereux)ら, Nucleic Acids Res. 1984, 12: 387)、BLASTN 2.0(ギッシュ(Gish)W., <http://blast.wustl.edu>, 1996-2002)、FASTA(ピアソン(Pearson)およびリップマン(Lipman), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85: 2444-2448)、および最長の重複を有する一対のコンティグを決定および整列するGCG GelMerge(ウィルバー(Wilbur)およびリ

ップマン (Lipman), SIAM J. Appl. Math. 1984, 44: 557-567; ニードルマン (Needleman) およびビュンシュ (Wunsch), J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453) を含むがそれらに限定されない。ここで用いられる「変異体」の語は、本発明で開示されたポリペプチドおよびタンパク質に関して、本発明の天然のポリペプチドまたはタンパク質の天然のアミノ酸配列の N 末端および / または C 末端におよび / または中に、1 個以上のアミノ酸が付加されたおよび / または置換されたおよび / または欠失したおよび / または挿入された、任意のポリペプチドまたはタンパク質をいう。さらに、「変異体」の語は、ポリペプチドまたはタンパク質の任意のより短いまたはより長い形を含む。「変異体」はまた、配列番号 1 および配列番号 2 の SULT4A1 のアミノ酸配列と、少なくとも約 80% 配列同一性、より好ましくは少なくとも約 90% 配列同一性、および非常に好ましくは少なくとも約 95% 配列同一性を有する配列も含む。タンパク質分子の「変異体」は、たとえば、高度に保存された領域に保存されたアミノ酸置換を有するタンパク質を含む。本発明の「タンパク質およびポリペプチド」は、配列番号 1 および配列番号 2 の SULT4A1 のアミノ酸配列を含むタンパク質の、変異体、断片、および化学的誘導体を含む。コドンが代替的な塩基配列によって別のコドンに置き換えられ、しかしその DNA 配列によって翻訳されるアミノ酸配列が変化しないままである配列変異を含めるべきである。この本分野で知られる現象は、特定のアミノ酸を翻訳するコドンの組の冗長性と呼ばれる。アルギニンをリジンに、バリンをロイシンに、アスパラギンをグルタミンにといった、機能性にまったく影響しないアミノ酸の交換もまた含めるべきである。天然から単離することができるかまたは、組み換えおよび / または合成の方法によって製造することができるタンパク質およびポリペプチドを含めることができる。ネイティブタンパク質またはポリペプチドは、天然に存在する短縮型または分泌型、天然に存在する変異型 (たとえばスプライス変異体) および天然に存在する対立遺伝子変異体をいう。ここで用いられる「単離された」の語は、天然の環境から変化および / または取り出された、すなわち通常存在する細胞からまたは生体から単離され、および天然で付随して見出される共存成分から分離されたかまたは本質的に精製された分子または物質をいうと考えられ、またそれらは「非ネイティブ」であるともいう。この概念はさらに、そのような分子をコードする配列を人間の手で、自然状態では結合していないポリヌクレオチドと結合させることができること、およびそのような分子を組み換えおよび / または合成の方法によって製造することができることを意味する (非ネイティブ)。前記の目的のためにそれらの配列が、当業者に既知である方法によって生体または死んだ生物に導入されても、およびそれらの配列が前記生物中にまだ存在していても、それらはなお単離されており、非ネイティブであると考えられる。本発明では、「リスク」、「感受性」、および「素因」の語は同等であり、神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病を発症する確率に関して用いられる。

【0014】

「AD」はアルツハイマー病を意味する。ここで用いられる「AD 型神経病理」は、本発明に記載されている通りの、および最先端の文献から一般に既知である通りの、神経病理学的、神経生理学的、組織病理学的、および臨床的な顕著な特徴をいう (イクバル (Iqbal), スワーブ (Swaab), ウィンブラッド (Winblad) およびウィスニュースキ (Wisniewski), 『アルツハイマー病と関連疾患 (疫学、病因論および治療薬)』 (Alzheimer's Disease and Related Disorders (Etiology, Pathogenesis and Therapeutics)), ワイリー・アンド・サンズ社 (Wiley & Sons), ニューヨーク (New York)、ワインハイム (Weinheim), トロント (Toronto), 1999; シント (Scinto) およびダフナー (Daffner), 『アルツハイマー病の早期診断』 (Early Diagnosis of Alzheimer's Disease), ヒューマナ・プレス社 (Humana Press), ニュージャージー州トトワ (Totowa) 2000; マイユ (Mayeux) およびクリステン (Christen) 『アルツハイマー病の疫学: 遺伝子から予防まで』 (Epidemi

ology of Alzheimer's Disease; From Gene to Prevention), シュプリングー・プレス社 (Springer Press), ベルリン (Berlin), ハイデルベルク (Heidelberg), ニューヨーク (New York), 1999; ヨーンキン (Younkin), タンジ (Tanzi) およびクリステン (Christen), 『プレセニリンとアルツハイマー病』 (Presenilins and Alzheimer's Disease), シュプリングー・プレス社, ベルリン, ハイデルベルク, ニューヨーク, 1998を参照)。「ブランク病期」または「ブランク病期分類」の語は、ブランクおよびブランクによって提案された判定基準に従った脳の分類をいう (ブランク (Braak) およびブランク (Braak), Acta Neuropathology 1991, 82: 239-259)。神経原線維変化およびニューロピル・スレッドの分布に基づいて、ADの神経病理学的進行は6つの病期に分けられる (病期0から6)。本発明では、ブランク病期0から2は対照健常人 (「対照」) を表し、およびブランク病期4から6はアルツハイマー病の患者 (「AD患者」) を表す。前記「対照」から得られた値が、「既知の健康状態」を表す「参照値」であり、および前記「AD患者」から得られた値が、「既知の疾患状態」を表す「参照値」である。ブランク病期3は、対照健常人またはAD患者のどちらかを表しうる。ブランク病期が高いほど、ADの症状を示す可能性が高い。神経病理学的評価、すなわちADの病理学的変化が痴呆の根本にある原因である確率の推定については、ブランク (Braak) Hによる提言が与えられている (www.alzforum.org)。

10

【0015】

20

本発明に記載の神経変性疾患または障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、ピック病、前頭側頭性痴呆症、進行性核麻痺、大脳皮質基底核変性症、脳血管性痴呆症、多系統変性症、嗜銀性顆粒痴呆症およびその他のタウオパシー、および軽度の認知障害を含む。神経変性過程を含むその他の症状は、たとえば、加齢黄斑変性、ナルコレプシー、運動神経細胞疾患、プリオン病および外傷性神経損傷および修復、および多発性硬化症である。

【0016】

一態様では、本発明は、被験者において神経変性疾患を診断または予測診断する、または被験者が前記疾患を発症する高いリスクがあるかどうかを判定する方法を扱う。その方法は：前記被験者由来の試料中の (i) SULT4A1をコードする遺伝子の転写産物の、および/または (ii) SULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物の、および/または (iii) 前記転写または翻訳産物の断片、または誘導体、または変異体の、レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を測定すること、および、前記レベル、および/または前記活性を、既知の疾患または健康状態を表す参照値と比較し、それによって前記被験者において前記神経変性疾患を診断または予測診断すること、または前記被験者が前記神経変性疾患を発症する高いリスクがあるかどうかを判定することを含む。「被験者において」という言い回しは、被験者が罹患する疾患に結果が関係する限りの、すなわち、前記疾患が被験者「において」存在する、開示された方法の結果をいう。

30

【0017】

本発明はまた、本発明に開示される通りの核酸配列、またはその断片、または変異体に独自のプライマーおよびプローブの構築および使用に関する。そのオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブは、蛍光、生物発光、磁性、または放射性物質で特異的に標識することができる。本発明はさらに、適当な組み合わせの前記特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いた、前記核酸配列、またはその断片および/または変異体の検出および製造に関する。PCR分析は、当業者によく知られた方法であるが、核酸を含む試料から前記遺伝子特異的核酸配列を増幅するために、前記プライマーの組み合わせを用いて実施することができる。そのような試料は、健常人または患者のどちらかから得ることができる。増幅の結果として特定の核酸産物を生じるかどうか、および異なる長さの断片を得ることができるかどうかは、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を示しうる。このように、本発明は、調べる核酸配列を含む任意の試料中の、神経変性疾患、特にアルツハ

40

50

イマー病と関連している可能性がある、遺伝子突然変異および一塩基多型の検出に有用な、少なくとも長さ10塩基、最大でコード配列および遺伝子配列全体の、核酸配列、オリゴヌクレオチドプライマー、およびプローブを提供する。この機能は、好ましくはまたキットの形式である、DNAに基づく迅速診断検査を開発するために有用である。

【0018】

別の態様では、本発明は被験者における神経変性疾患の進行を監視する方法を扱う。前記被験者由来の試料中の(i)SULT4A1をコードする遺伝子の転写産物の、および/または(ii)SULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物の、および/または(iii)前記転写または翻訳産物の断片、または誘導體、または変異体の、レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を測定する。前記レベルおよび/または前記活性を、既知の疾患または健康状態を表す参照値と比較する。それによって前記被験者において前記神経変性疾患の、アルツハイマー病の、進行を監視する。

10

【0019】

さらに別の態様では、本発明は、前記疾患について治療されている被験者由来の試料中の(i)SULT4A1をコードする遺伝子の転写産物の、および/または(ii)SULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物の、および/または(iii)前記転写または翻訳産物の断片、または誘導體、または変異体の、レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を測定することを含む、神経変性疾患の治療を評価する方法を扱う。前記レベル、または前記活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を、既知の疾患または健康状態を表す参照値と比較し、それによって前記神経変性疾患の、アルツハイマー病の、治療を評価する。

20

【0020】

ここで請求される本発明の方法、キット、組み換え動物、分子、分析法、および使用の好ましい一実施形態では、ヒトスルホトランスフェラーゼタンパク質をコードする前記遺伝子は、神経系細胞質スルホトランスフェラーゼNSTまたはSULTnともいう細胞質スルホトランスフェラーゼ、細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー4Aメンバー1タンパク質(SULT4A1)(EC2.8.2)をコードする遺伝子であり、Genbank登録番号AF176342で表され、またはBR-STL-1ともいいGenbank登録番号AF188698またはAF251263で表され、またはSULTX3ともいいGenbank登録番号AF115311で表される。別の好ましい一実施形態では、前記SULT4A1遺伝子は、SULT4A1アイソフォーム1、別名スプライス変異体1(SULT4A1sv1遺伝子、配列番号3、GenBank登録番号:AF176342)をコードし、タンパク質SLJLT4A1スプライス変異体1(SULT4A1sv1タンパク質、配列番号1、Genbank登録番号043728)をコードする。本発明では、前記SULT4A1sv1タンパク質をコードする遺伝子はまた、一般にSULT4A1遺伝子または単にSULT4A1という。さらに、SULT4A1またはSULT4A1sv1のタンパク質はまた、一般にSULT4A1タンパク質または単にSULT4A1という。本発明では、前記SULT4A1遺伝子はSULT4A1アイソフォーム2、別名スプライス変異体2(SULT4A1sv2遺伝子、配列番号4、GenBank登録番号:AF176342、ESTbi550483およびbm805353で表されるヌクレオチド190~528を欠く)をコードし、タンパク質SULT4A1スプライス変異体2(SULT4A1sv2タンパク質、配列番号2)をコードする。本発明では、前記SULT4A1sv2タンパク質をコードする遺伝子はまた、一般にSULT4A1遺伝子、または単にSULT4A1という。さらに、SULT4A1またはSULT4A1sv2のタンパク質はまた、一般にSULT4A1タンパク質または単にSULT4A1という。本発明では、前記配列はここで用語が用いられる通り「単離」されている。

30

40

【0021】

ここで請求される本発明の方法、キット、組み換え動物、分子、分析法、および使用の別の好ましい一実施形態では、前記神経変性疾患または障害はアルツハイマー病であり、

50

および前記被験者または患者はアルツハイマー病患者である。

【0022】

本発明は、対照者と比較したAD患者の特定の脳領域におけるSULT4A1遺伝子の、検出、および発現の差、および調節障害を開示する。さらに、本発明はSULT4A1の遺伝子発現がAD罹患脳で調節障害されていること、AD罹患脳でSULT4A1 mRNAレベルが側頭皮質および/または海馬において前頭皮質と比較してダウンレギュレートされている、または前頭皮質において側頭皮質および/または海馬と比較して上昇していることを開示する。SULT4A1発現は、年齢対応する対照健常者の前頭皮質および側頭皮質および/または海馬と、AD患者の前頭皮質および側頭皮質および/または海馬とを比較して異なる。したがって、SULT4A1遺伝子およびその対応する転写および翻訳産物(SULT4A1 sv1、SULT4A1 sv2)は、ADで典型的に観察される局所性選択的神経細胞変性の原因的な役割を有する可能性がある。SULT4A1は、本発明で開示および説明される通り、残りの生存神経細胞に神経保護機能を与える。これらの開示に基づき、本発明は、神経変性疾患、特にADの、診断評価および予測診断のために、および素因の検出に有用である。さらに、本発明は、そのような疾患のための治療を受けている患者の診断的監視のための方法を提供する。

10

【0023】

分析および測定する前記試料は、脳組織、脳細胞または他の組織または他の体細胞から成る群から選択されるのが好ましい。試料はまた、脳脊髄液または、唾液、尿、血液、血清、血漿、または粘液を含むその他の体液を含むことができる。好ましくは、本発明に記載の神経変性疾患の診断、予測診断、進行の監視、または治療の評価の方法は、体外で実施することができ、およびそのような方法は好ましくは、たとえば、被験者または患者または対照健常者から摘出、採取、または単離された体液または細胞といった試料に関する。

20

【0024】

さらに好ましい実施形態では、前記参照値は、前記神経変性疾患に罹患していない被験者由来の試料中の(対照健常者、対照試料、対照)、または、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を罹患している被験者由来の試料中の(患者試料、患者)、(i)SULT4A1をコードする遺伝子の転写産物の、および/または(ii)SULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物の、および/または(iii)前記転写または翻訳産物の断片、または誘導體、または変異体の、レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方の値である。

30

【0025】

好ましい実施形態では、既知の健康状態を表す参照値(対照試料)に対する、被験者に由来する試料細胞、または組織、または体液中の、SULT4A1をコードする遺伝子の転写産物の、および/またはSULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物の、および/またはその断片、または誘導體、または変異体の、レベルおよび/または活性における変化、変化したレベルおよび/または活性が、神経変性疾患、特にADに罹患する診断、または予測診断、または高リスクを示す。

【0026】

別の好ましい実施形態では、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の既知の疾患状態を表す参照値(AD患者試料)に対する、被験者に由来する試料細胞、または組織、または体液中の、SULT4A1をコードする遺伝子の転写産物の、および/またはSULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物の、および/またはその断片、または誘導體、または変異体の、等しいかまたは類似のレベルおよび/または活性は、前記神経変性疾患に罹患する診断、または予測診断、または高リスクを示す。好ましい実施形態では、SULT4A1をコードする遺伝子の転写産物のレベルの測定が、被験者から得られた試料において、被験者の試料から抽出されたRNAの逆転写によって得られたcDNAに由来する前記遺伝子特異的配列を増幅するために、プライマーの組み合わせを用いた定量的PCR分析を使用して実施される。プライマーの組み合わせは本発明の「実施例」に示されるが、本

40

50

発明で開示される通りの配列から生成される他のプライマーもまた用いることができる。前記遺伝子に特異的なプローブを用いたノーザンブロットもまた適用することができる。チップを基礎とするマイクロアレイ技術によって転写産物を測定することがさらに好ましい。これらの手法は当業者に公知である（サムブルック（Sambrook）およびラッセル（Russell）, 『分子クローニング：実験の手引き』（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス社（Cold Spring Harbor Laboratory Press）, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー, 2001; シェーナ（Schena）M., 『マイクロアレイバイオチップ技術』（Microarray Biochip Technology）, イートン・パブリッシング社（Eaton Publishing）, マサチューセッツ州ナティック（Natick）, 2000を参照）。免疫測定法の一例は、特許出願国際公開第02/14543号パンフレットに開示され記載される通り、酵素活性の検出および測定である。

10

20

30

【0027】

さらに、SULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物のおよび/または前記翻訳産物の断片、または誘導体、または変異体のレベルおよび/または活性、および/または、前記翻訳産物および/または前記翻訳産物の断片、または誘導体、または変異体の活性のレベルは、免疫測定法、活性測定法、および/または結合測定法によって検出することができる。これらの測定法は、前記タンパク質分子と抗タンパク質抗体との間の結合の量を、抗タンパク質抗体がまたはその抗タンパク質抗体と結合する二次抗体のどちらかに結合した、酵素、色力学、放射性、磁性、または発光標識を用いることによって測定することができる。加えて、他の高親和性リガンドを用いることができる。使用することができる免疫測定法は、たとえばELISA、ウェスタンブロット、および当業者に公知のその他の技術を含む（ハーロウ（Harlow）およびレーン（Lane）, (Harlow and Lane, 『抗体を用いて：実験の手引き』（Using Antibodies: A Laboratory Manual）, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス社（Cold Spring Harbor Laboratory Press）, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー, 1999およびエドワーズ（Edwards）R, 『免疫診断：実践的手法』（Immunodiagnosics: A Practical Approach）, オックスフォード大学出版会（Oxford University Press）, 英国オックスフォード, 1999を参照）。これらの検出方法すべてはまた、マイクロアレイ、タンパク質アレイ、抗体マイクロアレイ、組織マイクロアレイ、電子バイオチップ、またはタンパク質チップを基礎とする技術の形式で使用することができる（シェーナ（Schena）M., 『マイクロアレイバイオチップ技術』（Microarray Biochip Technology）, イートン・パブリッシング社（Eaton Publishing）, マサチューセッツ州ナティック（Natick）, 2000を参照）。

【0028】

好ましい一実施形態では、前記疾患の進行を監視するため、ある期間にわたって前記被験者から採取された一連の試料中の(i) SULT4A1をコードする遺伝子の転写産物のおよび/または(ii) SULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物のおよび/または(iii) 前記転写または翻訳産物の断片、または誘導体、または変異体の、レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方が比較される。さらに好ましい実施形態では、前記被験者は前記試料収集の1回以上の前に治療を受ける。さらに別の好ましい一実施形態では、前記レベルおよび/または活性は、前記被験者の前記治療の前および後に測定される。

40

【0029】

別の一態様では、本発明は被験者において神経変性疾患、特にADを診断するかまたは予測診断する、または被験者の神経変性疾患、特にADを発症する傾向または素因を判定するためのキットを扱い、前記キットは下記を含む：

50

(a) (i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の転写産物を選択的に検出する試薬 (i i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の翻訳産物を選択的に検出する試薬、から成る群から選択された少なくとも1つの試薬 ; および

(b) ・前記被験者に由来する試料中の、 S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の前記転写産物および / または前記翻訳産物の、レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を検出する ; および

・神経変性疾患、特に A D を診断するかまたは予測診断する、および / またはそのような疾患を発症する前記被験者の傾向または素因を判定する

段階を記載することによる、神経変性疾患、特に A D を診断するかまたは予測診断する、またはそのような疾患を発症する被験者の傾向または素因を判定するための指示

10

であって、既知の健康状態を表す参照値 (対照) と比較した前記転写産物および / または前記翻訳産物の、変化したレベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方、および / または、既知の疾患状態、好ましくは A D の疾患状態を表す参照値と同様であるかまたは等しい、前記転写産物および / または前記翻訳産物の、レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方が、神経変性疾患、特に A D の診断または予測診断、またはそのような疾患を発症する高い傾向または素因を示す。本発明に記載のキットは、神経変性疾患、特に A D を発症するリスクがある人の特定に特に有用である可能性がある。

【 0 0 3 0 】

したがって、別の一態様では、本発明は、被験者において神経変性疾患、特にアルツハイマー病を診断または予測診断する方法における、およびそのような疾患を発症する被験者の高い傾向または素因を判定する方法における、 (i) 前記被験者に由来する試料中の、 S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の転写産物および / または翻訳産物の、レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を検出、および (i i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の転写産物および / または翻訳産物の、前記レベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を、既知の健康状態を表す参照値および / または既知の疾患状態を表す参照値と比較し、および前記転写産物および / または前記翻訳産物の前記レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方が、既知の健康状態を表す参照値と比較して変動し、および / または既知の疾患状態を表す参照値と類似または等しい段階を含むキットの使用を扱う。

20

30

【 0 0 3 1 】

したがって、本発明の記載のキットは、疾患経過において不可逆的損傷が与えられる前に、特定された人を疾患の発症前の早期予防処置または治療的介入の対象とする方法となりうる。さらに、好ましい実施形態では、本発明で扱うキットは、被験者において神経変性疾患、特に A D の進行を監視、および前記被験者のそのような疾患について治療的処置の成功または失敗を監視および評価するのに有用である。

【 0 0 3 2 】

別の一態様では、本発明は、 (i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子、および / または (i i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の転写産物、および / または (i i i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または (i v) (i) から (i i i) の断片、または誘導体、または変異体の、レベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方に直接的にまたは間接的に影響を及ぼす、治療的にまたは予防的に有効な量の一または複数の物質の前記被験者への投与を含む、被験者において神経変性疾患、特に A D を治療または予防する方法を扱う。前記物質は低分子を含むことができ、またはペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドを含むこともできる。前記ペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドは、 S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列、またはその断片、または誘導体、または変異体を含むことができる。本発明に記載の、神経変性疾患、特に A D を治療するかまたは予防するための物質はまた、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドから成ることができる。前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、 S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の

40

50

ヌクレオチド配列を、センス方向かまたはアンチセンス方向のどちらかで含むことができる。

【0033】

好ましい実施形態では、本方法は前記の一または複数の物質を投与するための遺伝子治療および/またはアンチセンス核酸技術の本質的に既知である方法の応用を含む。一般的に、遺伝子治療はいくつかの手法を含む：変異遺伝子の分子的置換、治療用タンパク質の合成を結果として生じる新しい遺伝子の付加、および組み換え発現方法によるかまたは薬剤による内因性細胞遺伝子発現の調節。遺伝子導入法は詳細に記載されており（たとえばベール（Behr）, *Ace Chem Res* 1993, 26: 274 - 278 およびムリガン（Mulligan）, *Science* 1993, 260: 926 - 931を参照）、および細胞へのDNAの機械的マイクロインジェクションといった直接的遺伝子導入法、および生物ベクター（組み換えウイルス、特にレトロウイルスのような）またはモデルリポソームを用いる間接的方法、またはDNAのポリカチオンとの共沈を用いた遺伝子導入に基づく方法、化学的（溶媒、界面活性剤、ポリマー、酵素）または物理的手段（機械的、浸透圧、熱、電気ショック）による細胞膜の不安定化を含む。出生後の中枢神経系への遺伝子導入は詳細に記載されている（たとえばウォルフ（Wolff）, *Curr Opin Neurobiol* 1993, 3: 743 - 748を参照）。

10

【0034】

特に、本発明は、アンチセンス核酸治療、すなわちある種の重要な細胞へのアンチセンス核酸またはその誘導体の導入による、不適切に発現されたかまたは欠陥のある遺伝子のダウンレギュレーションを用いた、神経変性疾患を治療するかまたは予防する方法を扱う（たとえばギレスピー（Gillespie）, *DN&P* 1992, 5: 389 - 395；アグラワル（Agrawal）およびアクター（Akhtar）, *Trends Biotechnol* 1995, 13: 197 - 199；クルック（Crooke）, *Biotechnology* 1992, 10: 882 - 6を参照）。ハイブリダイゼーション戦略以外に、リボザイム、すなわち酵素として作用するRNA分子の、疾患のメッセージを運ぶRNAを破壊する適用もまた記載されている（たとえばバリナガ（Barinaga）, *Science* 1993, 262: 1512 - 1514を参照）。好ましい実施形態では、治療される被験者はヒトであり、および治療的アンチセンス核酸またはその誘導体はSULT4A1をコードする遺伝子の転写産物に対して向けられる。被験者の中枢神経系、好ましくは脳の細胞は、そのような方法で治療されるのが好ましい。細胞透過は、アンチセンス核酸およびその誘導体のキャリアー粒子へのカップリング、または上記の方法といった既知の戦略によって実施することができる。標的化した治療用オリゴデオキシヌクレオチドを投与するための戦略は当業者に公知である（たとえばウィックシュトロム（Wickstrom）, *Trends Biotechnol* 1992, 10: 281 - 287を参照）。一部の場合では、デリバリーは単なる局所投与によって実施することができる。別の手法はアンチセンスRNAの細胞内発現に向けられる。この戦略では、細胞は標的核酸の領域と相補的であるRNAの合成を指示する組み換え遺伝子を用いて*ex vivo*で形質転換される。細胞内で発現されたアンチセンスRNAの治療的使用は、手続的に遺伝子治療と同様である。RNA干渉（RNAi）としてさまざまに知られる、二本鎖RNAを用いて遺伝子の細胞内発現を調節する近年開発された方法は、核酸治療のもう一つの有効な手法である可能性がある（ハノン（Hannon）, *Nature* 2002, 418: 244 - 251）。

20

30

40

【0035】

さらに好ましい実施形態では、本方法は前記被験者の中枢神経系、好ましくは脳に、ドナー細胞、または好ましくは移植片拒絶を最小化または低減するように処理されたドナー細胞を移植することを含み、前記ドナー細胞は前記一または複数の物質をコードする少なくとも一つの導入遺伝子の挿入によって遺伝子組み換えされている。前記導入遺伝子は、ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターによって運ばれうる。導入遺伝子は、導入遺伝子をコードするDNAの非ウイルス物理的遺伝子導入によって、特にマイクロイン

50

ジェクションによってドナー細胞へ挿入することができる。導入遺伝子の挿入はまた、エレクトロポレーション、化学的媒介遺伝子導入、特にリン酸カルシウム遺伝子導入またはリポソーム媒介遺伝子導入によっても実施することができる（マクセルランド（McCelland）およびパーディー（Pardee）、『発現遺伝学：迅速および高処理量法』（Expression Genetics；Accelerated and High-Throughput Methods）、イートン・パブリッシング社（Eaton Publishing）、マサチューセッツ州ナティック（Natick）、1999を参照）。

【0036】

好ましい実施形態では、神経変性疾患、特にADを治療および予防するための前記物質は、対象細胞を前記被験者に導入し、ここで前記対象細胞は前記治療用タンパク質をコードするDNA断片を挿入するために*in vitro*で処理されており、前記対象細胞が*in vivo*で前記被験者において治療的に有効な量の前記治療用タンパク質を発現することを含む過程によって、前記被験者、好ましくはヒトに投与することができる治療用タンパク質である。前記DNA断片は、前記細胞へ*in vitro*でウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターによって挿入することができる。

10

【0037】

本発明に記載の、治療の方法は、前記の細胞治療的および遺伝子治療的方法の任意のものと組み合わせた、治療的クローニング、移植、および胚性幹細胞または胚性生殖細胞および神経細胞性成体幹細胞を用いた幹細胞治療の適用を含む。幹細胞は全能性または多能性でありうる。それらはまた器官特異性でもありうる。罹患および/または損傷した脳細胞または組織を修復する戦略は、(i)ドナー細胞を成体組織から採取することを含む。これらの細胞の核は、遺伝物質が除去されている未受精卵細胞に移植される。胚性幹細胞は、体細胞核移植を受けた細胞の胚盤胞期から単離される。その時、分化因子の使用は、特化した細胞型、好ましくは神経細胞への幹細胞の分化誘導に繋がる（ランザ（Lanza）ら、*Nature Medicine* 1999, 9: 975-977）、または(ii)*in vitro*での拡大およびその後の移植のために、中枢神経系から、または骨髄（間葉性幹細胞）から単離された成体幹細胞を精製する、または(iii)内因性神経幹細胞を直接、増殖、移動、および機能する神経細胞へ分化するように誘導する（ピーターソン（Peterson）DA, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2002, 2: 34-42）。成体脳の胚中心は神経細胞損傷または機能障害が存在しないため、成体神経幹細胞は、損傷したかまたは罹患した脳組織を修復する大きな可能性がある（コルマン（Colman）A, *Drug Discovery World* 2001, 7: 66-71）。

20

30

【0038】

好ましい実施形態では、本発明に記載の治療または予防の被験者は、ヒト、実験動物、たとえばマウスまたはラットまたはハエ、家畜、または非ヒト霊長類であることができる。実験動物は、神経変性疾患の動物モデル、遺伝子改変動物、たとえば、好ましくはADの症状を示しAD型神経病理を示す、遺伝子導入マウスまたはハエおよび/またはノックアウトマウスまたはハエであることができる。

40

【0039】

別の態様では、本発明は、(i)SULT4A1をコードする遺伝子、および/または(ii)SULT4A1をコードする遺伝子の転写産物、および/または(iii)SULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iv)(i)から(ii)の断片、または誘導體、または変異体から成る群から選択される少なくとも一つの物質の、活性、またはレベル、または前記活性および前記レベルの両方の調節因子を扱う。

【0040】

別の態様では、本発明は、前記調節因子および好ましくは医薬キャリアーを含む医薬組成物を扱う。前記キャリアーは、希釈剤、アジュバント、賦形剤、または調節因子と共に投与する媒体をいう。

50

【 0 0 4 1 】

別の態様では、本発明は、医薬組成物における使用のための (i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子、および / または (i i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の転写産物、および / または (i i i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または (i v) (i) から (i i i) の断片、または誘導体、または変異体から成る群から選択される少なくとも一つの物質の、活性、またはレベル、または前記活性および前記レベルの両方の調節因子を扱う。

【 0 0 4 2 】

別の態様では、本発明は、神経変性疾患、特に A D を治療するかまたは予防するための薬剤の調製のための (i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子、および / または (i i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の転写産物、および / または (i i i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または (i v) (i) から (i i i) の断片、または誘導体、または変異体から成る群から選択される少なくとも一つの物質の、活性、またはレベル、または前記活性および前記レベルの両方の調節因子の使用を提供する。

10

【 0 0 4 3 】

一態様では、本発明はまた、治療的にまたは予防的に有効な量の前記医薬組成物を詰めた一個以上の容器を含むキットを提供する。

【 0 0 4 4 】

別の態様では、本発明はヒトおよび / またはマウス S U L T 4 A 1 (細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1) をコードする遺伝子の非天然核酸分子のおよび翻訳産物、タンパク質分子の、および / またはその断片、または誘導体、または変異体の、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 6 に示す核酸分子の、および配列番号 1、配列番号 2 に示すタンパク質分子の、遺伝子導入動物および / またはノックアウト動物である組み換え、遺伝子操作された非ヒト動物を作製するための標的分子としての使用を扱う。前記遺伝子操作非ヒト動物は、哺乳類、好ましくはげっ歯類、より好ましくはマウスまたはラットまたはモルモットであることが好ましい。前記遺伝子操作非ヒト動物は、非脊椎動物、好ましくは昆虫、より好ましくはショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* といった八足であることがさらに好ましい。さらに、前記遺伝子操作非ヒト動物は、家畜、または非ヒト霊長類でありうる。一実施形態では、前記遺伝子操作の発現は、神経変性疾患に類似した神経病理の症状、特に、とりわけ A D の組織学的性質および A D に特徴的な行動変化を含む、A D (A D 型神経病理) に類似した神経病理の症状を発症する素因を示すおよび / または症状を示す非ヒト動物を結果として生じる。別の一実施形態では、前記遺伝子操作の発現は、前記非ヒト動物を遺伝子操作するのに用いられた遺伝子の発現によって引き起こされた有益な作用のために、神経変性疾患に類似した症状を発症するリスクが低い、特に A D に類似した神経病理の症状を発症するリスクが低い、および / または A D 症状の低減を示すおよび / または A D の症状を有しない非ヒト動物を結果として生じる。

20

30

【 0 0 4 5 】

一態様では、本発明は、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 6 に示す通りの、および配列番号 1 および配列番号 2 に示す通りの、S U L T 4 A 1 (細胞質スルホトランスフェラーゼファミリー 4 A メンバー 1) をコードする非天然遺伝子配列、またはその断片または誘導体、または変異体を含む組み換え、遺伝子操作非ヒト動物を扱う。S U L T 4 A 1 をコードする前記非天然遺伝子配列は、ヒトおよび / またはマウス S U L T 4 A 1 遺伝子配列でありうる。前記組み換え、遺伝子操作非ヒト動物の作製は、(i) ヒトおよび / またはマウス S U L T 4 A 1 の遺伝子配列、または断片、または前記遺伝子配列の変異体、および選択可能なマーカー配列を含む遺伝子ターゲティング構造を提供、および (i i) 前記ターゲティング構造を非ヒト動物の幹細胞へ、胚性幹 (E S) 細胞へ導入、および (i i i) 前記非ヒト動物幹細胞を非ヒト胚へ導入、および (i v) 前記胚を偽妊娠非ヒト動物へ移植、および (v) 前記胚を満期まで発生させること、および (v i) ゲノムが

40

50

一方または両方の対立遺伝子に前記遺伝子配列の修飾を含む遺伝子操作非ヒト動物を特定すること、および(vii)段階(vi)の遺伝子操作非ヒト動物を繁殖させて、ゲノムが前記内因性遺伝子の修飾を含む遺伝子操作非ヒト動物を得ることを含む。前記遺伝子操作非ヒト動物は、発現が異所性発現、または低発現、または過剰発現、または非発現である、組み換え、操作された遺伝子を発現することが好ましい。ヒトおよび/またはマウスSULT4A1の遺伝子配列および選択可能なマーカー配列を含むそのようなターゲティング構造、および、前記組み換え、操作されたSULT4A1遺伝子の非ヒト遺伝子操作動物における発現の例は本発明に開示される(実施例(Vii)、(viii)および図20から25を参照)。

【0046】

好ましい一実施形態では、前記遺伝子破壊または抑制または活性化または前記遺伝子操作の発現は、神経変性疾患の神経病理に類似した症状、特にADに類似した神経病理(AD型神経病理)の症状を発症する素因を示すおよび/または症状を示す前記非ヒト動物を結果として生じる。

【0047】

別の好ましい一実施形態では、前記遺伝子操作の発現は、前記非ヒト動物を遺伝子操作するのに用いられた遺伝子の発現によって引き起こされた、有益な作用でありうる作用のために、神経変性疾患に類似した症状を発症するリスクが低い、特にADに類似した神経病理の症状を発症するリスクが低い、および/またはAD症状の低減を示す、および/またはADの症状を有しない非ヒト動物を結果として生じる。

【0048】

本発明の別の好ましい一実施形態では、前記遺伝子操作非ヒト動物は、哺乳類、好ましくはげっ歯類、より好ましくはマウスまたはラットまたはモルモットである。前記遺伝子操作非ヒト動物は、非脊椎動物、好ましくは昆虫、より好ましくはショウジョウバエ*Drosophila melanogaster*といったハエであることがさらに好ましい。さらに、前記遺伝子操作非ヒト動物は、家畜、または非ヒト霊長類でありうる。前記遺伝子操作非ヒトは、遺伝子導入動物および/またはノックアウト動物である。

【0049】

別の好ましい一実施形態では、前記組み換え、遺伝子操作非ヒト動物は、本分野で一般に知られる通り、アルツハイマー病動物モデルと交雑される。ヒトアルツハイマー前駆体タンパク質(APP)またはAPPの突然変異型、たとえばスウェーデン変異を有するAPP、および/または文献に記載された通りの既知の変異を有するヒトプレセニリン-1または-2(ジェイナス(Janus)およびウェスタウェイ(Westaway), *Physiology Behavior* 2001, 873-886; リチャーズ(Richards)ら, *J. Neuroscience* 2003, 23: 8989-9003)および/または既知の変異を有するヒトTau、たとえばP301L変異(ゴッツ(Gotz)ら, *J. Biological Chemistry* 2001, 276: 529-534)を発現する遺伝子導入マウス、またはアルツハイマー様病理を発症するこれらまたは他のマウス突然変異体からの二または三遺伝子導入動物といった、アルツハイマー病マウスモデルを用いるのが好ましい。他のアルツハイマー病動物モデルは、神経原線維変化および/またはアミロイド斑を生じることができる組み換え動物モデル; ヒトまたはマウスtauまたは4反復アイソフォームまたはP301L変異tauといったtauアイソフォームのようなtauタンパク質をコードする組み換え遺伝子を発現する組み換え動物モデル; アミロイド前駆体タンパク質または変異アミロイド前駆体タンパク質、または - アミロイドをコードする組み換え遺伝子を発現する組み換え動物モデル; セクレターゼ、ガンマ-セクレターゼ、ベータ-セクレターゼまたはアルファ-セクレターゼ、プレセニリン1またはプレセニリン2をコードする組み換え遺伝子を発現する組み換え動物モデル; および上記の組み換え遺伝子の組み合わせを発現する任意の組み換え動物モデルでありうる。

【0050】

10

20

30

40

50

前記交雑は、アルツハイマー病の背景で、神経変性疾患に類似の神経病理の症状、特に、とりわけADの組織学的性質およびADに特徴的な行動変化を含む、ADに類似の神経病理の症状（AD型神経病理）を発症するおよび/または示す強化および促進された素因を有する、SULT4A1ノックアウト動物または遺伝子導入SULT4A1動物を結果として生じる。

【0051】

別の好ましい実施形態では、前記交雑は、アルツハイマー病の背景で、前記非ヒト動物を遺伝子操作するのに用いられた遺伝子の発現によって引き起こされた有益な作用のために、AD症状が低減した、または神経変性疾患に類似した症状を発症するリスクが低い、特にADに類似した神経病理の症状を発症するリスクが低い、またはADの症状を有しないSULT4A1ノックアウト動物または遺伝子導入SULT4A1動物を結果として生じる。

10

【0052】

遺伝子操作非ヒト遺伝子導入動物および/またはノックアウト動物は、実験動物として、被験動物として、神経変性疾患についての動物モデルとして、好ましくはアルツハイマーについての動物モデルとして、用いることができる。神経病理学的性質を示すおよび/または症状の低減を示すそのような遺伝子操作非ヒト動物の例は、本発明に開示される（実施例および図面を参照）。

【0053】

そのような遺伝子導入および/またはノックアウト動物の作製および構築のための戦略および技術は当業者に公知であり（たとえばカベッキ（Capecchi）、Science 1989, 244: 1288-1292 およびホーガン（Hogan）ら、『マウス胚操作：実験の手引き』（Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual）、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス社（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー、1994 およびジャクソン（Jackson）およびアボット（Abbott）、『マウス遺伝学および遺伝子組み換え：実践的手法』（Mouse Genetics and Transgenics; A Practical Approach）、オックスフォード大学出版会、英国オックスフォード、1999を参照）、および本発明に詳細に記載される（実施例および図面を参照）。

20

30

【0054】

本発明の別の態様では、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を調べるための動物モデルとして、そのような組み換え、遺伝子操作非ヒト動物、遺伝子導入またはノックアウト動物を利用するのが好ましい。そのような動物は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を治療するための診断薬および治療薬の開発において、化合物、物質、および調節因子を、スクリーニング、試験、および評価するのに有用な被験動物または実験動物でありうる。

【0055】

別の態様では、本発明は、神経変性疾患、特にAD、または（i）SULT4A1をコードする遺伝子、および/または（ii）SULT4A1をコードする遺伝子の転写産物、および/または（iii）SULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または（iv）（i）から（iii）の断片、または誘導體、または変異体から成る群から選択される一種類以上の物質の、関連する疾患および異常の、調節因子についてのスクリーニングのための測定法を扱い、その方法は下記を含む（a）神経変性疾患または関連する疾患または障害を発症する素因を有するかまたはすでに発症している、被験動物または実験動物または動物モデルへ被験化合物を投与、および（b）（i）から（iv）で列挙された一種類以上の物質の、活性および/またはレベルを測定、および（c）等しく前記疾患を発症する素因を有するかまたはすでに発症している、およびそのような被験化合物が投与されていない、対応する対照動物中の前記物質の、活性および/またはレベル

40

50

を測定、および (d) 段階 (b) および (c) の動物中の物質の活性および / またはレベルを比較し、ここで被験動物、または実験動物、または動物モデル中の物質の活性および / またはレベルの変化は被験化合物が前記疾患および障害の調節因子であることを示す。

【 0 0 5 6 】

好ましい一実施形態では、本発明に開示される通り、前記被験動物、または実験動物、または動物モデルおよび / または前記対照動物は、天然 S U L T 4 1 遺伝子転写調節配列でない転写調節配列の調節下にある、S U L T 4 1 をコードする遺伝子、またはその断片、または誘導体、または変異体を発現する、組み換え、遺伝子操作非ヒト動物である (下記参照) 。

【 0 0 5 7 】

別の態様では、本発明に記載の遺伝子操作非ヒト動物は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の治療のための治療法、または調節物質、または化合物の有効性を測定または評価するための *i n v i v o* 検定法を提供する。

【 0 0 5 8 】

別の態様では、本発明は、神経変性疾患、特に A D、または (i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子、および / または (i i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の転写産物、および / または (i i i) S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または (i v) (i) から (i i i) の断片、または誘導体、または変異体から成る群から選択される一種類以上の物質の、関連する疾患および異常の、調節因子についてのスクリーニングのための測定法を扱う。このスクリーニング方法は下記を含む (a) 細胞を被験化合物、物質、または調節因子と接触させること、および (b) (i) から (i v) で列挙された一種類以上の物質の、活性、またはレベル、または活性およびレベルの両方を測定すること、および (c) 前記被験化合物と接触させていない対照細胞中の前記物質の、活性、またはレベル、または活性およびレベルの両方を測定すること、および (d) 段階 (b) および (c) の細胞中の物質のレベルを比較し、ここで、接触させた細胞中の前記物質の活性および / またはレベルの変化は被験化合物、または物質、または調節因子が前記疾患および障害の調節因子であることを示し、前記調節因子は (i) から (i v) で列挙された一種類以上の物質の、活性、またはレベル、または活性およびレベルの両方でありうる。本発明で開示される通りの、S U L T 4 A 1 タンパク質を過剰発現する細胞、好ましくは S U L T 4 A 1 タンパク質を安定に過剰発現する細胞といった、前記スクリー 30
ニング検定法で用いられる細胞の例を下記に示す (実施例 (v) および図 1 8)。前記細胞を用いる検定法の詳細な例が本発明で開示される (実施例 (v i) および図 1 9 を参照) 。

【 0 0 5 9 】

遺伝子操作動物および細胞およびスクリーニング検定法の例は単なる説明であり、および開示の残りを限定することを決して意図しない。

【 0 0 6 0 】

別の一実施形態では、本発明は、(i) 前述のスクリーニング測定の方法によって神経変性疾患の調節因子を特定する、および (i i) 調節因子を医薬キャリアーと混合する段階を含む、薬剤を製造する方法を提供する。しかし、前記調節因子はまた、他の種類のスクリーニング測定法によっても特定することができる。

【 0 0 6 1 】

別の態様では、別の態様では、本発明は、リガンドと、S U L T 4 A 1 タンパク質、またはその断片、または誘導体、または変異体との間の結合の阻害について、化合物を試験するための、好ましくは複数の化合物をスクリーニングするための測定法を提供する。前記スクリーニング測定法は、(i) 前記 S U L T 4 A 1 タンパク質、またはその断片、または誘導体、または変異体の懸濁液を複数の容器に加える、および (i i) 前記阻害についてスクリーニングする一または複数の化合物を前記複数の容器に加える、および (i i i) 検出可能な、好ましくは蛍光標識リガンドを前記容器に加える、および (i v) 前記 S U L T 4 A 1 タンパク質、またはその前記断片、または誘導体、または変異体、お 50

10

20

30

40

50

よび前記一または複数の化合物、および前記検出可能な、好ましくは蛍光標識リガンドをインキュベートする、および(v)前記SULT4A1タンパク質に、またはその前記断片、または誘導体、または変異体に結合した蛍光の量を測定する、および(vi)前記リガンドの、前記SULT4A1タンパク質、またはその前記断片、または誘導体、または変異体への結合の、一種類以上の前記化合物による阻害の程度を測定する段階を含む。リガンドと前記SULT4A1翻訳産物との間の結合の阻害を測定するためには、前記SULT4A1翻訳産物、またはその断片、または誘導体、または変異体を、人工リボソーム中に再構成し、対応するプロテオリボソームを作製するのが好ましい可能性がある。界面活性剤からリボソームへのSULT4A1翻訳産物の再構成の方法は詳しく説明されている(シュワルツ(Schwarz)ら, Biochemistry 1999, 38: 9456-9464; クリヴォシェフ(Krivoshchev)およびウサノフ(Usanov), Biochemistry - Moscow 1997, 62: 1064-1073)。蛍光標識リガンドを利用する代わりに、一部の態様では、当業者に公知である任意のその他の検出可能な標識、たとえば放射性標識を用い、およびそれをしかるべく検出するのが好ましい可能性がある。前記方法は、新規化合物の同定に、および、SULT4A1をコードする遺伝子の遺伝子産物、またはその断片、または誘導体、または変異体へのリガンドの結合を阻害する能力が改良されたかまたはそうでなければ最適化された化合物を評価するために有用である可能性がある。キャリア粒子の使用を基礎としたこの場合の蛍光結合測定法の一例は、特許出願国際公開第00/52451号パンフレットに開示され記載されている。別の一例は、特許国際公開第02/01226号パンフレットに記載された競合測定法である。本発明のスクリーニング測定法のために好ましいシグナル検出方法は、下記の特許出願に記載されている：国際公開第96/13744号、第98/16814号、第98/23942号、第99/17086号、第99/34195号、第00/66985号、第01/59436号および第01/59416号パンフレット。

【0062】

別の一実施形態では、本発明は、(i)前述の阻害結合測定法によって、化合物を、リガンドとSULT4A1をコードする遺伝子の遺伝子産物との間の結合の阻害因子として特定する、および(ii)その化合物を医薬キャリアと混合する段階を含む、薬剤を製造する方法を提供する。しかし、前記化合物はまた、他の種類のスクリーニング測定法によっても特定できる可能性がある。

【0063】

別の一態様では、本発明は、SULT4A1タンパク質との、またはその断片、または誘導体、または変異体との前記化合物の結合の程度を測定する、化合物を試験するための、好ましくは複数の化合物をスクリーニングするための測定法を扱う。前記スクリーニング測定法は、(i)前記SULT4A1タンパク質、またはその断片、または誘導体、または変異体の懸濁液を複数の容器に加える、および(ii)前記結合についてスクリーニングする検出可能な、好ましくは蛍光標識された化合物、または検出可能な、好ましくは蛍光標識された複数の化合物を前記複数の容器に加える、および(iii)前記SULT4A1タンパク質と、またはその前記断片、または誘導体、または変異体と、前記検出可能な、好ましくは蛍光標識された化合物、または検出可能な、好ましくは蛍光標識された複数の化合物をインキュベートする、および(iv)前記SULT4A1タンパク質と、またはその前記断片、または誘導体、または変異体と結合した好ましくは蛍光の量を測定する、および(v)前記SULT4A1タンパク質への、またはその前記断片、または誘導体、または変異体への、一種類以上の前記化合物による結合の程度を測定する段階を含む。この型の測定では、蛍光標識を用いるのが好ましい。しかし、任意の他の種類の検出可能な標識もまた使用することができる。またこの型の測定では、SULT4A1翻訳産物またはその断片、または誘導体、または変異体を、本発明に記載の通り、人工リボソーム中に再構成するのが好ましい可能性がある。前記測定法は、新規化合物の同定に、およびSULT4A1、またはその断片、または誘導体、または変異体へ結合する能力が改良

されたかまたはそうでなければ最適化された化合物を評価するために有用である可能性がある。

【0064】

別の一実施形態では、本発明は、(i)前述の結合測定法によって、SULT4A1をコードする遺伝子の遺伝子産物への結合因子として化合物を特定する、および(ii)その化合物を医薬キャリアーと混合する段階を含む、薬剤を製造する方法を提供する。しかし、前記化合物はまた、他の種類のスクリーニング測定法によっても特定できる可能性がある。

【0065】

別の一実施形態では、本発明は、ここで請求するスクリーニング測定法に記載の方法のうち任意のものによって得ることができる薬剤を提供する。別の一実施形態では、本発明は、ここで請求するスクリーニング測定法に記載の方法のうち任意のものによって得られた薬剤を提供する。

10

【0066】

本発明は、配列番号1および配列番号2に示される、SULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物であるタンパク質分子、またはその断片、または誘導体、または変異体、および、神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病を検出するための診断標的としてのその使用を扱う。

【0067】

さらに、本発明は、配列番号1および配列番号2に示される、SULT4A1をコードする遺伝子の翻訳産物であるタンパク質分子、またはその断片、または誘導体、または変異体、および、神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病を予防、または治療、または改善する試薬または化合物についてのスクリーニング標的としての使用のためのその使用を扱う。

20

【0068】

本発明は、SULT4A1遺伝子の翻訳産物、またはその断片、または誘導体、または変異体である免疫原と、特異的に免疫反応する抗体を扱う。その免疫原は、前記遺伝子の翻訳産物の免疫原性または抗原性のエピトープまたは部分を含むことができ、ここで翻訳産物の前記免疫原性または抗原性部分はポリペプチドであり、および前記ポリペプチドは抗体反応を動物において導き、前記ポリペプチドは前記抗体によって免疫特異的に結合している。抗体を作製する方法は本分野でよく知られている(ハーロウ(Harlow)ら、『抗体-実験の手引き』(Antibodies, A Laboratory Manual), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー, 1988を参照)。本発明で使用される「抗体」の語は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、組み換え、抗イデオタイプ、ヒト化、または一本鎖抗体、およびその断片といった、当該分野で既知のすべての型の抗体を包含する(デュベル(Dubel)およびブライトリンク(Breitling), 『組み換え抗体』(Recombinant Antibodies), ワイリー・リース社(Wiley-Liss), ニューヨーク州ニューヨーク, 1999)。本発明の抗体は、たとえば(ハーロウ(Harlow)およびレーン(Lane), (Harlow and Lane, 『抗体を用いて: 実験の手引き』(Using Antibodies: A Laboratory Manual), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー, 1999およびエドワーズ(Edwards)R, 『免疫診断: 実践的手法』(Immunodiagnosics: A Practical Approach), オックスフォード大学出版会(Oxford University Press), 英国オックスフォード, 1999を参照)、酵素免疫測定法(たとえば酵素結合免疫吸収測定法、ELISA)、ラジオイムノアッセイ、化学発光免疫測定法、ウェスタンブロット、免疫沈降法、および抗体マイクロアレイといった、最

30

40

50

先端の方法を基礎とするさまざまな診断および治療方法で有用である。これらの方法は、S U L T 4 A 1をコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、または誘導体、または変異体の検出を含む。

【0069】

本発明の好ましい一実施形態では、前記抗体は被験者に由来する試料中の細胞の病理状態を検出するのに用いることができ、前記抗体を用いた前記細胞の免疫細胞化学染色を含み、ここで既知の健康状態を表す細胞と比較した前記細胞における染色の程度の変化、または染色パターンの変化は、前記細胞の病理状態を示す。好ましくは、病理状態は神経変性疾患、特にADに関係する。細胞の免疫細胞化学染色は、本分野でよく知られたいくつかの異なる実験法によって実施することができる。しかし、抗体結合の検出には自動化法を適用するのが好ましく、ここで、細胞の染色の程度の判定、または細胞の細胞染色または細胞成分染色のパターンの判定、または細胞表面上または細胞内のオルガネラおよびその他の細胞下構造の間の抗原のトポロジカルな分布は、米国特許第6150173号明細書に記載の方法に従って実施される。

10

【0070】

本発明のその他の特性および利点は、単なる説明であり、および開示の残りを限定することを決して意図しない下記の図および実施例の説明から明らかになる。

【実施例】

【0071】

(i) AD患者由来の脳組織解剖：

AD患者および対応する年齢の対照被験者由来の脳組織を死後6時間以内に採取し、直ちにドライアイス上で凍結した。診断の組織病理学的確認のため、各組織からの試料切片はパラホルムアルデヒドで固定した。発現差の分析のための脳の部分を特定し、RNA抽出を実施するまで-80にて保存した。

20

【0072】

(ii) 総mRNAの単離：

総RNAは、RNeasyキット(キアゲン(Qiagen))を取扱説明書に従って使用することによって、死後脳組織から抽出した。正確なRNA濃度およびRNA品質は、DNAラプチップ(LabChip)系を用いてアジレント(Agilent)2100バイオアナライザー(アジレント・テクノロジーズ(Agilent Technologies))を使用して測定した。調製したRNAの追加の品質試験、すなわち部分分解の排除およびDNA混入に関する試験は、特に設計したイントロンGAPDHオリゴヌクレオチドおよび参照対照としてゲノムDNAを使用して、ライトサイクラー(LightCycler)技術を取扱説明書(ロシュ(Roche))に従って用いて融解曲線を作成した。

30

【0073】

(iii) cDNA合成および発現差のある遺伝子の蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ(FDD)による特定：

異なる組織における遺伝子発現の変化を特定するために、我々は改変および改良したディファレンシャル・ディスプレイ(DD)スクリーニング法を使用した。元のDDスクリーニング法は当業者に公知である(リャン(Liang)およびパーディー(Pardoe), Science 1995, 267: 1186-7)。この方法は、RNAの2つの集団を比較し、および一方の集団で発現されているが他方の集団では発現されていない遺伝子のクローンを提供する。いくつかの試料を同時に分析ことができ、および同一の実験でアップおよびダウンレギュレートされる遺伝子の両方を特定できる。DD法でのいくつかの段階を調整および改良し、および技術的パラメーターを修正、たとえば冗長性を増大、総RNAの逆転写のための最適化された試薬および条件を評価、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)およびその産物の分離を最適化することによって、高再現性および高感度の結果を可能にする方法が開発された。その応用および改良されたDD法はフォン・デル・カマー(von der Kammer)ら(Nucleic Acids Research

40

50

ch 1999, 27: 2211 - 2218) によって詳細に記載された。可能なすべての RNA 種の統計的に包括的な分析を達成するために、64 種類の特に設計されたランダムプライマーの組が開発された (標準セット。さらに、蛍光標識化されたプライマーの使用に基づいて、本方法は修正されて調製用 DD スラブゲル法を生じた。本発明では、AD 患者および対応する年齢の対照被験者の注意深く選択された死後脳組織 (前頭および側頭皮質) に由来する RNA 集団を比較した。

【0074】

DD 分析の開始材料として、我々は、上記 (ii) の通り抽出された総 RNA を用いた。各 0.05 μ g の等量の RNA を、各 0.5 mM の dNTP、1 μ l のセンススクリプト (Sensiscript) 逆転写酵素および 1x RT 緩衝液 (キアゲン (Qiagen))、10 U RNアーゼ阻害因子 (キアゲン) および 1 μ M のいずれかの一塩基アンカーオリゴヌクレオチド HT₁₁A、HT₁₁G または HT₁₁C を含む 20 μ l の反応物中で cDNA に転写した (リャン (Liang) ら、Nucleic Acids Research 1994, 22: 5763 - 5764; チャオ (Zhao) ら、Biotechniques 1995, 18: 842 - 850)。逆転写は 60 分間 37 °C にて実施し、93 °C にて 5 分間の最終変性段階を伴った。得られた cDNA の各 2 μ l は、対応する一塩基アンカーオリゴヌクレオチド (1 μ M) を、Cy3 標識化ランダム DD プライマー (1 μ M) のいずれか 1 つ、1x ジーンアンプ (GeneAmp) PCR 緩衝液 (アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems))、1.5 mM MgCl₂ (アプライド・バイオシステムズ)、2 μ M dNTP 混合物 (dATP、dGTP、dCTP、dTTP アマシャム・ファルマシア・バイオテック (Amersham Pharmacia Biotech))、5% DMSO (シグマ (Sigma))、1 U AmpliTaq DNA ポリメラーゼ (アプライド・バイオシステムズ) と共に用いて、終容量 20 μ l 中でポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に供した。PCR 条件は下記の通り設定した: 94 °C にて 30 秒間 1 回で変性、1 °C / 秒で 40 °C まで冷却、40 °C にて 4 分間でプライマーの低厳密性アニーリング、1 °C / 秒で 72 °C まで加熱、72 °C にて 1 分間で伸長。この回に続いて、高厳密性サイクル 39 回を実施した: 94 °C にて 30 秒、1 °C / 秒で 60 °C まで冷却、60 °C にて 2 分間、1 °C / 秒で 72 °C まで加熱、72 °C にて 1 分間。最後のサイクルに、72 °C にて 5 分間の最終段階 1 回を加えた (PCR サイ클ラー: マルチサイクラー PTC 200、MJ リサーチ (MJ Research))。8 μ l の DNA 負荷緩衝液を 20 μ l の PCR 産物調製物に加え、5 分間変性し、およびゲルへの負荷まで氷上に保持した。各 3.5 μ l を厚さ 0.4 mm の 6% ポリアクリルアミド (ロングレンジャー (Long Ranger)) / 7 M 尿素シーケンスゲルで、スラブゲルシステム (日立ジェネティック・システムズ (Hitachi Genetic Systems)) で 2000 V、60 W、30 mA にて、1 時間 40 分で分離した。電気泳動の完了後、ゲルを FMBIO II 蛍光スキャナー (日立ジェネティック・システムズ) で、適当な FMBIO II Analysis 8.0 ソフトウェアを用いてスキャンした。原寸画像を印刷し、発現差のあるバンドに印を付け、ゲルから切り出し、1.5 ml 容器へ移し、200 μ l の滅菌水を加え、および抽出まで -20 °C にて保存した。

【0075】

DD 産物の溶出および再増幅: 200 μ l の H₂O 中で 10 分間煮沸し、氷上で冷却し、および上清液からエタノール (メルク (Merck)) およびグリコーゲン / 酢酸ナトリウム (メルク) を用いて -20 °C にて一夜沈澱、および続いて 13,000 rpm で 25 分間 4 °C にて遠心分離によって、差のあるバンドをゲルから抽出した。沈澱を氷冷エタノール (80%) で 2 回洗浄し、10 mM トリス pH 8.3 (メルク) に再懸濁し、および 10% グリセロール (メルク) に対して 1 時間室温にて 0.025 μ m VSWP 膜 (ミリポア (Millipore)) 上で透析した。得られた調製物は、DD PCR (上記参照) に用いられた通りの対応するプライマーを含む 25 μ l の PCR 混合物中での、初回 94 °C 5 分間、次いで 94 °C にて 45 秒、60 °C にて 45 秒、傾斜 1 °C / 秒で 70 °C 45 秒、および 72 °C にて 5 分間の最終段階 1 回以外は同一条件下での、15 回の高厳密性

サイクルによる増幅のためのテンプレートとして使用した。

【0076】

DD産物のクローニングおよび配列決定：

増幅されたcDNAをDNAラプチップ(LabChip)システム(アジレント2100バイオアナライザー、アジレント・テクノロジーズ(Agilent Technologies))で分析し、および取扱説明書に従ってPCR-プラント(Blunt)II-TOPOベクターヘライゲーションし、および大腸菌(E.coli)Top10F'細胞へ形質転換した(ゼロプラント(Zero Blunt)TOPO PCRクローニングキット、インビトロジェン(Invitrogen))。クローニングされたcDNA断片は市販の配列決定設備によって配列決定した。SULT4A1遺伝子について10

【0077】

(iv)発現の差の定量RT-PCRによる確認：

側頭皮質対前頭皮質における、および海馬対前頭皮質におけるSULT4A1遺伝子発現、すなわちそれぞれSULT4A1sv1および/またはsv2およびSULT4A1sv1の差の裏付けを、ライトサイクラー(LightCycler)技術(ロシュ(Roche))を用いて実施した。この方法は、ポリメラーゼ連鎖反応についての迅速熱サイクリング、および増幅中の蛍光シグナルのリアルタイム測定を扱い、およびしたがって、終点計測値でなく動力学を用いたRT-PCR産物の高精度な定量を可能にする。AD患者のおよび対応する年齢の健常対照者の側頭皮質由来、AD患者のおよび対応する年齢の健常対照者の前頭皮質由来、AD患者および対応する年齢の健常対照者の海馬由来の、SULT4A1cDNAの比、およびAD患者のおよび対応する年齢の健常対照者の側頭皮質および前頭皮質由来のSULT4A1cDNAの比、およびAD患者のおよび対応する年齢の健常対照者の海馬および前頭皮質由来のSULT4A1cDNAの比をそれぞれ測定した(相対的定量)。20

【0078】

SULT4A1sv1および/またはsv2の、およびSULT4A1sv1の、前頭皮質組織(F)と下側頭皮質組織(T)との間のmRNA発現プロファイリングを、各ブランク病期につき4~最大9の組織で分析した。ブランク3病理を有するドナー1名からの高品質組織が無かったため、ブランク3病理を有する追加の1名のドナーの組織を含め、およびブランク6病理を有するドナー1名からの高品質組織が無かったため、ブランク5病理を有する追加の1名のドナーの組織試料を含めた。30

【0079】

プロファイリングの分析のため、2つの一般的手法を用いている。それぞれSULT4A1の、SULT4A1sv1の、およびSULT4A1sv2の、AD生理における関連の複合像に寄与する、下側頭皮質に対する前頭皮質、およびAD患者に対する対照の両方の比較プロファイリング試験を下記に詳細に示す。

【0080】

1)対照の、およびAD患者の、前頭皮質組織と下側頭皮質組織との間のmRNA発現の相対比較。この手法は、同定された遺伝子SULT4A1(SULT4A1sv1, SULT4A1sv2)が、変性に対する脆弱性のより低い組織(前頭皮質)の保護に関与しているか、または、脆弱性のより高い組織(下側頭皮質)の変性過程に関与するかまたはそれを促進するかを検証することを可能にした。40

【0081】

最初に、PCRの効率を測定するため、SULT4A1スプライス変異体1および/またはスプライス変異体2遺伝子についてのプライマー(SULT4A1sv1とSULT4A1sv2とを区別しないプライマー)：

5'-CAAAGTGGTGGTCAGGAGGGT-3'(配列番号3、ヌクレオチド2064-2084;配列番号4、ヌクレオチド1725-1745)を用いて、および5'-CCGTTTCAAATACAGCACCAAG-3'(配列番号3、ヌクレオチド50

2 1 1 0 - 2 1 3 1 ; 配列番号 4、ヌクレオチド 1 7 7 1 - 1 7 9 2) ;
 および S U L T 4 A 1 スプライス変異体 1 遺伝子だけに関する特異的プライマー : 5 ' -
 C T G A C C C C G A T G A G A T C G - 3 ' (配列番号 3、ヌクレオチド 2 3 5 - 2 5
 2) および 5 ' - G G C A G G T G G C T C T T G A T G A - 3 ' (配列番号 3、ヌクレオ
 チド 3 4 0 - 3 5 8) ; を用いて、

および S U L T 4 A 1 スプライス変異体 2 遺伝子だけに関する特異的プライマー : 5 ' -
 T C A C C T A C C C C A A G T C C G T - 3 ' (配列番号 4、ヌクレオチド 1 7 2 - 1
 9 0) および 5 ' - T T C A T A C T T G A G A A A A G C A C G T - 3 ' (配列番号 4
 、ヌクレオチド 2 5 0 - 2 7 2) を用いて、標準曲線を作成した。

【 0 0 8 2 】

P C R 増幅 (9 5 で 1 秒間 , 5 6 で 5 秒間、および 7 2 で 5 秒間) を、ライトサイ
 クラー・ファストスタート DNA マスター SYBR グリーン I (L i g h t C y c l e
 r - F a s t S t a r t D N A M a s t e r S Y B R G r e e n I) 混合物 (ファ
 ストスタート Taq DNA ポリメラーゼ、反応緩衝液、d T T P の代わりに d U T P を含
 む d N T P 混合物、SYBR グリーン I 色素、および 1 m M M g C l₂ ; ロシュ (R o c
 h e))、0 . 5 μ M プライマー、2 μ l の c D N A 希釈系列 (終濃度 4 0、2 0、1 0
 、5、1 および 0 . 5 n g ヒト脳総 c D N A ; クローンテック (C l o n t e c h)) お
 よび、使用プライマーに応じて追加の 3 m M M g C l₂ を含む 2 0 μ l 容量中で実施した
 。融解曲線分析は、約 8 4 にて S U L T 4 A 1 s v 1 および / または S U L T 4 A 1 s
 v 2 遺伝子プライマーについて、8 7 . 5 にて S U L T 4 A 1 s v 1 遺伝子特異的プライ
 マーについて、および 8 7 . 2 にて S U L T 4 A 1 s v 2 遺伝子特異的プライ
 マーについて、それぞれに単一ピークを示し、プライマー二量体は見られなかった。P C R 産物
 の品質および大きさは DNA ラブチップ (L a b C h i p) システムを用いて測定した (アジレント 2 1 0 0
 バイオアナライザー、アジレント・テクノロジーズ (A g i l e n t
 T e c h n o l o g i e s)) 。試料の電気泳動図で S U L T 4 A 1 s v 1 および / ま
 たは S U L T 4 A 1 s v 2 遺伝子について 6 8 b p の予測サイズに、f o r t h e S U L
 T 4 A 1 s v 1 遺伝子について 1 2 4 b p に、および S U L T 4 A 1 s v 2 遺伝子につい
 て 1 0 1 b p に、それぞれ、単一ピークが観察された。

【 0 0 8 3 】

同様の方法で、P C R 手順を適用して、定量用の参照標準として選択された参照遺伝子
 の組の P C R 効率を測定した。本発明では、5 種類のそのような参照遺伝子の平均値を測
 定した ; (1) シクロフィリン B、特異的プライマー 5 ' - A C T G A A G C A C T A C
 G G G C C T G - 3 ' および 5 ' - A G C C G T T G G T G T C T T T G C C - 3 ' を用い
 M g C l₂ を省いて (別に 1 m M を 3 m M の代わりに加えた) 。融解曲線分析は約 8 7
 に単一ピークを示し、プライマー二量体は見られなかった。P C R 産物のアガロースゲル
 分析は、予想サイズ (6 2 b p) の単一バンド一本を示した。(2) リボソームタンバ
 ク質 S 9 (R P S 9)、特異的プライマー 5 ' - G G T C A A A T T T A C C C T G G C
 C A - 3 ' および 5 ' - T C T C A T C A A G C G T C A G C A G T T C - 3 ' を用いて (
 例外 ; 別に 1 m M M g C l₂ を 3 m M の代わりに加えた) 。融解曲線分析は約 8 5 に単
 一ピークを示し、プライマー二量体は見られなかった。P C R 産物のアガロースゲル分析
 は、予想サイズ (6 2 b p) を有する単一バンド一本を示した。(3) ベータアクチン、
 特異的プライマー 5 ' T G G A A C G G T G A A G G T G A C A - 3 ' および 5 ' - G G C
 A A G G G A C T T C C T G T A A - 3 ' を用いて。融解曲線分析は約 8 7 に単一ピー
 クを示し、プライマー二量体は見られなかった。P C R 産物のアガロースゲル分析は、予
 想サイズ (1 4 2 b p) を有する単一バンド一本を示した。(4) G A P D H、特異的プ
 ライマー 5 ' C G T C A T G G G T G T G A A C C A T G - 3 ' および 5 ' - G C T A A G
 C A G T T G G T G G T G C A G - 3 ' を用いて。融解曲線分析は約 8 3 に単一ピー
 クを示し、プライマー二量体は見られなかった。P C R 産物のアガロースゲル分析は、予想
 サイズ (8 1 b p) を有する単一バンド一本を示した。(5) トランスフェリン受容体 T
 R R、特異的プライマー 5 ' - G T C G C T G G T C A G T T C G T G A T T - 3 ' および

10

20

30

40

50

5'AGCAGTTGGCTGTTGTACCTCTC-3'を用いて。融解曲線分析は約83 に単一ピークを示し、プライマー二量体は見られなかった。PCR産物のアガロースゲル分析は、予想サイズ(80bp)を有する単一バンド一本を示した。

【0084】

値の計算のために、まずcDNA濃度の対数を、SULT4A1について、すなわちSULT4A1sv1および/またはSULT4A1sv2について、SULT4A1スプライス変異体1単独について、およびSULT4A1スプライス変異体2単独について、および5種類の参照標準遺伝子についてのサイクル数閾値C_tに対してプロットした。標準曲線の傾きおよび切片(すなわち直線回帰)をすべての遺伝子について計算した。次の段階で、AD患者のおよび対照健常者の前頭皮質由来、AD患者のおよび対照健常者の側頭皮質由来、AD患者のおよび対照健常者の海馬由来のcDNA、および、AD患者のおよび対照者の前頭皮質および側頭皮質由来、およびAD患者のおよび対照者の前頭皮質および海馬由来のcDNAを、それぞれ平行して分析しシクロフィリンBに対して正規化した。C_t値を測定し、対応する標準曲線を用いてng総脳cDNAに変換した:

10^{-(C_t値 - 切片) / 傾き} [ng 総脳DNA]

【0085】

側頭および前頭皮質SULT4A1cDNA(SULT4A1sv1および/またはSULT4A1sv2の、SULT4A1sv1の、およびSULT4A1sv2の)についての値、海馬および前頭皮質SULT4A1cDNAについての値、およびAD患者(P)および対照者(C)の前頭皮質SULT4A1cDNAからの値、およびAD患者(P)および対照者(C)の側頭皮質SULT4A1cDNAについての値は、シクロフィリンBに対して正規化し、および比を下記の式に従って計算した:

比 = SULT4A1側頭[ng] / シクロフィリンB側頭[ng] / SULT4A1前頭[ng] / シクロフィリンB前頭[ng]

比 = SULT4A1海馬[ng] / シクロフィリンB海馬[ng] / SULT4A1前頭[ng] / シクロフィリンB前頭[ng]

比 = SULT4A1(P)側頭[ng] / シクロフィリンB(P)側頭[ng] / SULT4A1(C)側頭[ng] / シクロフィリンB(C)側頭[ng]

比 = SULT4A1(P)前頭[ng] / シクロフィリンB(P)前頭[ng] / SULT4A1(C)前頭[ng] / シクロフィリンB(C)前頭[ng]

【0086】

三番目の段階で、参照標準遺伝子の組を平行して分析し、個別の脳試料それぞれについて参照標準遺伝子の発現レベルの、対照者対AD患者側頭皮質比の、対照者対AD患者前頭皮質比、およびAD患者および対照者の前頭対側頭比の、およびAD患者および対照者の前頭対海馬比の平均値をそれぞれ決定したシクロフィリンBを段階2および段階3で分析し、また、一つの遺伝子から別の遺伝子への比は別々の分析で一定のままであったため、SULT4A1についての値、すなわちSULT4A1sv1および/またはSULT4A1sv2について、SULT4A1sv1単独について、およびSULT4A1sv2単独についてそれぞれを、単一の遺伝子だけに対して正規化するのでなく、参照標準遺伝子の組の平均値に対して正規化することが可能であった。計算は、上記に示すそれぞれの比を、すべてのハウスキーピング遺伝子の平均値からのシクロフィリンBの偏差で割ることによって行った。SULT4A1スプライス変異体1および/またはスプライス変異体2を、SULT4A1スプライス変異体1単独を、およびSULT4A1スプライス変

10

20

30

40

50

異体2単独をコードする遺伝子についてのそのような定量的RT-PCR分析の結果およびそれぞれの計算値を図2、3および15に、図4および16に、および図5にそれぞれ示す。

【0087】

2) 対照とAD患者との間のmRNA発現の比較。

この分析に関して、別の時点での別の実験間のリアルタイム定量PCR(ライトサイクラー(Lightcycler)法)の絶対値は、キャリブレーターを使用しない定量比較に用いるのに十分に一貫性があることが証明された。シクロフィリンを、100を超える組織について、qPCR実験のどれでも正規化のための標準物質として用いた。我々の正規化実験において、中でもシクロフィリンは最も一貫して発現されたハウスキーピング遺伝子であることが見出された。したがって、シクロフィリンに関して生じた値を用いることによって概念実証が行われた。

10

【0088】

第一の分析は、3名の異なるドナー由来の前頭皮質および下側頭皮質組織のqPCR実験からのシクロフィリン値を用いた。分析したすべての実験で、各組織から同一のcDNA調製物を用いた。この分析の中では、データ数の小ささのため、値の正規分布は達成されなかった。したがって、中央値およびその98%信頼レベルの方法を用いた。この分析は、絶対値の比較について中央値から8.7%の中間偏差、および相対値の比較について中央値から6.6%の中間偏差を明らかにした。

【0089】

第二の分析は、それぞれ2名の異なるドナー由来の前頭皮質および下側頭皮質組織のqPCR実験からのシクロフィリン値を用いたが、異なる時点からの異なるcDNA調製物を用いた。この分析、絶対値の比較について中央値から29.2%の中間偏差、および相対値の比較について中央値から17.6%の中間偏差を明らかにした。この分析から、qPCR実験からの絶対値を使用できるが、しかし中央値からの中間偏差はさらに考慮されるべきであると結論されたSULT4A1について絶対値の詳細な分析を実施した。したがって、シクロフィリンを用いた相対的正規化後にSULT4A1の絶対レベルを用いた。中央値および98%信頼レベルを対照群(ブランク0~ブランク3)および患者群(ブランク4~ブランク6)についてそれぞれ計算した。同じ分析を、対照群(ブランク0~ブランク2)および患者群(ブランク3~ブランク6)を再定義して実施し、および対照群(ブランク0~ブランク1)および患者群(ブランク2~ブランク6)を再定義して実施した。後者の分析は、対照とAD患者との間のmRNA発現差の初期出現を見出すことを目的とした。この分析の別の視点では、遺伝子発現調節および初期出現差の傾向を見出すため、それぞれブランク病期0~1、ブランク病期2~3、およびブランク病期4~6を含む3群を互いに比較した。上記の通りの前記分析を図6および7に示す。

20

30

【0090】

(v) 免疫蛍光分析(IF):

細胞中のSULT4A1タンパク質の免疫蛍光染色のために、スウェーデン変異を有するヒトAPP695アイソフォームを安定に発現する(K670N、M671L)ヒト神経膠腫細胞株(H4細胞)を使用した(H4APPsw細胞)。H4APPsw細胞に、SULT4A1のコード配列(配列番号6、855bp)およびmyc-タグを含むPFB-Neoベクター(ストラタジーン(Stratagene)、#217561、6.6kb)を用いて形質導入した(pFBNeo-SULT4A1cds-myc、SULT4A1ベクター、7483bp)。SULT4A1ベクターの作製については、SULT4A1cds-myc配列をPFB-Neoベクターのマルチクロニングサイト(MCS)のXhoI-BamHI制限部位へ導入した。ForofthewiththeSULT4A1ベクターを用いたH4APPsw細胞の形質導入には、ストラタジーン(Stratagene)のレトロウイルス発現系バイラポート(ViraPort)を使用した。

40

【0091】

50

フェラーゼファミリー4Aメンバー1 (S u l t 4 A 1)、別名S 4 A 1 (U n i g e n e 番号: M m . 2 4 8 7 9 6 ; 遺伝子ID: 2 9 8 5 9、遺伝子座N T _ 0 3 9 6 2 1) である。マウスS u l t 4 A 1 遺伝子は第15染色体上に位置し、および284アミノ酸のタンパク質をコードする7個のエクソンから成り、および配列番号1に示すヒトS U L T 4 A 1 配列と98%同一性を共有する。マウスS u l t 4 A 1 遺伝子についてはこれまでのところ、スプライス変異体は見出されていない。ヒトではS U L T 4 A 1 遺伝子の別のスプライス変異体が発見されている。ヒトS U L T 4 A 1 スプライス変異体1およびスプライス変異体2は本明細書に開示される。これらはマウス遺伝子と一部のホモロジーを共有するため、これらのスプライス変異体がマウス系にも存在することは度外視できない。マウスS u l t 4 A 1 タンパク質の機能ドメインは、エクソン1~7からコードされる 10
スルホトランスフェラーゼドメインである。そのドメイン内には、エクソン1、3および5上に位置する、スルホトランスフェラーゼの3個の保存されたアミノ酸モチーフ(ファラニー(F a l a n y)ら, B i o c h e m J . 2 0 0 0 , 8 5 7 - 8 6 4)を見出すことができる。

【0094】

S u l t 4 A 1 遺伝子ターゲティングベクターの構築のために、マウスS u l t 4 A 1 1ホモロジー配列をゲノムG 5 7 B L / 6 J D N A (マウス系統C 5 7 B L / 6 J) から、標準のPCR手順を用いて増幅した。短ホモロジーアーム(S A)は約2.9kb(エクソン1と2の間のイントロン配列)から成り、および長ホモロジーアーム(L A)は約7kbから成る。S u l t 4 A 1 の酵素機能は、内因性マウスS U L T 4 A 1 遺伝子配 20
列のエクソン2およびエクソン3、4および5の主な部分を置換するNeoカセット(ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、クローン選択についてP g kプロモーターによって動作するネオマイシン耐性遺伝子、選択可能なマーカー配列)のエクソン2への挿入によって破壊される。構築されたターゲティングベクターおよびターゲティング戦略を図20に示す。Neoカセットは上記で概説した通り2つの高度に保存されたアミノ酸モチーフを置換し、およびそれによってスルホトランスフェラーゼドメインを破壊する。N e o 選択マーカーはP G Kプロモーターによって動作し、およびF R T 部位(F L P リコンビナーゼの認識部位)に隣接され、必要に応じて、NeoカセットのF L P リコンビナーゼ(部位特異的リコンビナーゼ)による除去を可能にする。Neoカセットの3'位で、スプライス受容体およびポリAシグナル配列(p A)が、選択マーカーが除去された際 30
に転写産物の終止を保証する。したがって、スルホトランスフェラーゼドメインの約25アミノ酸である、エクソン1およびエクソン2の一部だけが転写される。エクソン6および7は、なおフレーム中に存在するが、スプライス受容体およびポリAモチーフが転写を終止させるため転写されず、結果として遺伝子の機能的ロックアウトを生じる。加えて、エクソン2と5を交換することによって、ヒトで観察される通りの機能的代替スプライス型が妨げられる。

【0095】

上記に示す構築されたターゲティングベクターをクローニングし、およびさらに、C 5 7 B L / 6 N マウス胚性幹(E S)細胞へ遺伝子導入した。E S細胞の遺伝子導入は最新技術に従って実施した(ホーガン(H o g a n)ら、『マウス胚操作: 実験の手引き』 40
(M a n i p u l a t i n g t h e M o u s e E m b r y o ; A L a b o r a t o r y M a n u a l), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス社(C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s), ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー, 1994 およびジャクソン(J a c k s o n) およびアボット(A b b o t t), 『マウス遺伝学および遺伝子組み換え: 実践的手法』(M o u s e G e n e t i c s a n d T r a n s g e n i c s ; A P r a c t i c a l A p p r o a c h), オックスフォード大学出版会, 英国オックスフォード, 1999)。
相同組み換え後、ターゲティングされたE S細胞クローンは、サザンブロット分析によって特定され、標準的方法を用いて胚盤胞へ注入されてキメラマウスを生じた(チムス(T y m m s) およびコーラ(K o l a): 『遺伝子ロックアウト手順』(G e n e 50

Knock Out Protocols), ヒューマナ・プレス社 (Humana Press) 2001)。作製されたキメラマウスの生殖細胞系列への遺伝子導入の成功後、キメラマウスをアルツハイマー病マウスモデルと交雑し、アルツハイマー病背景上でホモ接合 SULT4A1 ノックアウトマウスを作製した。

【0096】

神経細胞でヒト Sult4A1 cDNA を特異的に発現するように Sult4A1 遺伝子導入マウスを作製した。この目的のために、ヒト Sult4A1 のオープン・リーディング・フレーム (ORF SULT4A1) cDNA を、神経特異的発現を指示する脳 - 特異的 Thy-1 調節配列 (Thy-1.2 プロモーターおよび調節配列) を含みおよびしたがって脳細胞だけで発現を生じるマウス Thy1.2 発現カセットへクローニングした (ルシ (Luthi) およびファン・デル・プッテン (van der Putten), J. Neurosci. 1997, 17: 4688 - 4699)。Rosa26 遺伝子座 (第6染色体上のマウス Rosa ベータ geo26 遺伝子; サイブラー (Seibler) ら, Nucleic Acids Research 2003, 31: e12) へその配列を組み込むために、導入遺伝子を Rosa26 ターゲティングベクターへクローニングした。導入遺伝子の 5' 端に Neo 選択マーカーを配置した (図 21 参照)。Neo カセットは、内因性 Rosa26 遺伝子由来の Rosa プロモーターによって動作する Neo 選択マーカーの発現を可能にするスプライス受容体を含む (フリードリヒ (Friedrich) およびソリアノ (Soriano), Genes Dev. 1991, 5: 1513 - 1523; ザムブロウィツ (Zambrowicz) ら, Proc Natl Acad Sci USA 他, 94: 3789 - 3794)。Neo マーカーの 3' 端のポリ A シグナル (pA) が転写および Rosa プロモーターの影響を停止する。本ターゲティングベクターは、Rosa26 遺伝子座への相同組み換えを可能にする、ゲノム 129S6 DNA 由来の Rosa26 ホモロジー配列を含む。短ホモロジーアーム (SA) は約 1.1 kb から成り、長ホモロジーアーム (LA) は 4.3 kb から成る。

【0097】

ターゲティングベクターはクローニングされ、およびさらに、C57BI/6N マウス ES 細胞へ遺伝子導入される (ホーガン (Hogan) ら, 『マウス胚操作: 実験の手引き』 (Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー, 1994 およびジャクソン (Jackson) およびアボット (Abbott), 『マウス遺伝学および遺伝子組み換え: 実践的手法』 (Mouse Genetics and Transgenics; A Practical Approach), オックスフォード大学出版会, 英国オックスフォード, 1999)。相同組み換え後、ターゲティングされた ES 細胞クローンは、サザンブロット分析によって特定され、標準的方法を用いて胚盤胞へ注入されてキメラマウスを生じた (チムス (Tymms) およびコーラ (Kola): 『遺伝子ノックアウト手順』 (Gene Knock Out Protocols), ヒューマナ・プレス社 (Humana Press) 2001)。作製されたキメラマウスの生殖細胞系列への遺伝子導入の成功後、キメラマウスをアルツハイマー病マウスモデルと交雑し、アルツハイマー病背景上で遺伝子導入 SULT4A1 マウスを作製した。

【0098】

(viii) 遺伝子導入ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の作製:

ヒト BACE 遺伝子導入ハエおよびヒト SULT4A1 遺伝子導入ハエを、グリーブら (Greeve ら, J. Neurosci. 2004, 24: 3899 - 3906) に従って、および本発明に記載の通り作製した。SULT4A1 sv1 のオープン・リーディング・フレーム全体 (配列番号 6) を含む 918 bp の NotI / BssHI - ブラント断片を、ベクター PLJASTNotI / XbaI - ブラントへ GAL4 結合部位 UAS

10

20

30

40

50

の下流にサブクローニングした(ブランド(Brand)およびペリモン(Perri mon), Development 1993, 118: 401-15)。Pエレメント媒介生殖細胞系列形質転換を、スプラドリング(Spradling)およびルビン(Rubin)によって記載された通り実施した(ルビンおよびスプラドリング, Science 1982, 218: 348-53; スプラドリングおよびルビン, Science 1982, 218: 341-7)。20の独立したヒトSULT4A1遺伝子導入ハエ系統を作製し、および3つの異なる系統を本分析に用いた。

【0099】

ヒトAPPおよびショウジョウバエ(Drosophila)プレセニリン遺伝子導入ハエ、UAS-APP695IIおよびUAS-DPsn-変異体(L235P)、はR . パロ(Paro)およびE . フォーティニ(Fortini)より提供を受けた(フォスグリーン(Foss green)ら, Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95: 13703-8; イエ(Ye)およびフォーティニ(Fortini), J Cell Biol 1999, 146: 1351-64)。アクチン-GAL4系統はブルーミントン・ストック・センター(Bloomington stock center)から入手した。F . ピグノニ(Pignoni)からのgmr-GAL4系統を、導入遺伝子の眼特異的発現を達成するために用いた。

【0100】

遺伝交雑を標準ショウジョウバエ培地上で25にて設定した。使用した遺伝子型は: w; UAS-hAPP6g5、UAS-hBACE437/CyO; gmr-GAL4/Tm3-w; UAS-hAPP6g5、UAS-hBACE437/CyO; gmr-GAL4、UAS-DPsn1_235P/Tm3-w; UAS-SULT4A1sv1#3(第3染色体、生存可能な挿入)-w; UAS-SULT4A1sv1#8/Tm3-w; UAS-SULT4A1sv1#22/CyO。

【0101】

免疫組織化学的および組織学的分析のために、成体ハエを下記の方法にしたがって免疫染色しおよび調製した。免疫染色のためには、成体ハエを4%パラホルムアルデヒド中で3時間固定し、1xPBSで洗浄し、および25%ショ糖中へ移して4にて一夜インキュベートした。ハエを剃刀で頭部切断し、および頭部をティシュー・テック(Tissue Tek) (サクラ(Sakura))に包埋しおよび急速凍結した。10μm凍結横断切片をクリオスタット(ライカ(Leica)CM3050S)で調製した。免疫染色はベクタステイン・エリート(Vectastain Elite)キット(ベクター・ラボラトリーズ(Vector Laboratories))を用いて取扱説明書に従って実施した。下記の一次抗体を使用した: 24B10(アルファ-カオプチン、1:5)、デベロップメンタル・スタディーズ(Developmental Studies)より供給。

【0102】

ハイブリドーマバンクの作製: チオフラビンS染色については、切片を5分間マイヤーヘマトキシリン(シグマ(Sigma))で対比染色し、水道水中で10分間洗浄し、および3分間1%チオフラビンS(シグマ)水溶液中で染色した。スライドを、蒸留水を何回か交換して洗浄し、15分間1%酢酸中でインキュベートし、水道水で洗浄し、およびベクタシールド(Vectashield)封入剤(ベクター・ラボラトリーズ(Vector Laboratories))に封入した。スライドはオリンパスBX51蛍光顕微鏡下で分析した(励起430nm、放出550nm)。

【0103】

ウェスタンブロットティングによるタンパク質分析については、ハエ頭部を1xPBS、5mMEDTA、0.5%トリトンX-100およびプロテアーゼインヒビターミックス・コンプリート(ロシュ・アプライドサイエンス(Roche Applied Science))中でホモジナイズした。等量のタンパク質を10%SDS-PAGEにより分離し、イモビロン(Immobilon)膜(ミリポア社(Millipore G

10

20

30

40

50

m b H)) へ転写し、5%スキムミルク中で2時間室温にてブロッキングし、およびモノクローナル抗体 2 2 C 1 1 (A P P N 末端特異的、ケミコン・インターナショナル (C h e m i c o n i n t e r n a t i o n a l)) とインキュベートした。結合した抗体を、ヤギ抗マウスペルオキシダーゼ結合二次抗体 (ディアノバ (D i a n o v a)) で検出した。免疫沈降については、ハエ頭部を上記の通りホモジナイズし、および溶解物をクローンテック社 (C l o n t e c h) の抗体手順ガイドに記載の通り処理した。抗体 m a b 6 E 1 0 (アルファ - A ベータ 1 - 1 6 , シグネット・パソロジー・システムズ (S i g n e t P a t h o l o g y S y s t e m s)) および m a b 4 G 8 (アルファ - A ベータ 1 7 - 2 4 , シグネット・パソロジー・システムズ) を免疫沈降に用いた。試料を 1 0 ~ 2 0 % 勾配ノベックス (N o v e x) トリス - トリシングル (インビトロジェン (I n v i t r o g e n)) で分離し、およびプロトラン (P r o t r a n) B A 7 9 硝酸セルロース膜 (0 . 1 μ m , シュライヒャー・シュール (S c h l e i c h e r / S c h u e l l) , ドイツ・ダッセル (D a s s e l)) へプロットした。ベータ - アミロイドの検出は、記載の通り (イダ (I d a) ら , J B i o l C h e m 1 9 9 6 , 2 7 1 : 2 2 9 0 8 - 1 4) , m a b 6 E 1 0 およびヤギ抗マウスペルオキシダーゼ結合二次抗体 (ディアノバ) を用いて実施した。

10

【0104】

遺伝子導入ショウジョウバエにおけるヒト S U L T 4 A 1 発現の検出については、逆転写酵素 P C R (R T - P C R 反応) 反応を、本発明に記載の通り (実施例 (i v)) S U L T 4 A 1 スプライス変異体 1 特異的プライマーを用いて実施した。

20

【0105】

遺伝子導入ハエにおけるヒト A P P (ベータ - アミロイド前駆体タンパク質、h A P P) のアミロイド形成過程に伴う神経病理に及ぼすヒト S U L T 4 A 1 発現の潜在的影響を特徴づけるため、眼特異的 G A L 4 系統 g m r - G A L 4 を用いることによって、成体網膜で S U L T 4 A 1 s v 1 を h A P P およびヒト B A C E (ベータ位 A P P 切断酵素、h B A C E) と同時発現させた。g m r - G A L 4 の調節下の S U L T 4 A 1 s v 1 の遺伝子導入発現は、R T - P C R によって、スプライス変異体 1 特異的プライマーを用いて確認された。P C R 反応は、図 2 2 A に示す通り、予想された融点およびサイズの断片を結果として生じた。3つの異なる遺伝子導入ハエ系統を用いた (S U L T 4 s v A 1 # 3 , # 8 および # 2 2) 。発現効率における相対差はサイクル数に従って計算し (図 2 2 B) およびハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。この計算に基づいて、S U L T 4 A 1 s v 1 遺伝子導入ハエ系統 # 3 はハエ系統 # 8 よりも 1 . 8 倍強く、およびハエ系統 # 2 2 よりも 2 . 7 倍強く発現される (図 2 2 B) 。

30

【0106】

ショウジョウバエの成体網膜における h A P P および h B A C E の発現は、光受容体細胞の加齢依存性変性に繋がる (グリーブ (G r e e v e) ら , J . N e u r o s c i . 2 0 0 4 , 2 4 : 3 8 9 9 - 3 9 0 6) 。 S U L T 4 A 1 の同時発現は、若齢 (図 2 3 A および B , 3 日齢) および老齢ハエ (図 2 3 A および B , 8 および 1 9 日齢ハエ) において、S U L T 4 A 1 s v 1 導入遺伝子の発現効率に依存して、光受容体細胞変性を救済する。R T - P C R 反応に従って計算された最高の発現効率を示すハエ系統 S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 (図 2 3 A) は、若齢および老齢ハエにおける変性表現型の顕著な救済に繋がる一方、ハエ系統 S U L T 4 A 1 s v 1 # 8 (図 2 3 B) は弱くしか救済せず、および S U L T 4 A 1 s v 1 (図 2 3 C) は h A P P / h B A C E / h S U L T 4 A 1 s v 1 3 遺伝子導入ハエにおいて変性表現型に干渉を示さない。None of the 遺伝子導入ハエ系統のいずれも、g m r - G A L 4 単独の調節下で発現された場合、光受容体細胞の適切な構築および分化に干渉しない (図 2 3 A ~ B , 1 列目) 。

40

【0107】

h A P P / h B A C E 発現ハエにおける光受容体細胞変性に及ぼす S U L T 4 A 1 の神経保護作用をさらに特徴づけるため、我々は 3 遺伝子導入ハエにおける h A P P の発現およびプロセッシングを調査し、および我々のモデル系で A P P に関連する神経病理に最高の

50

影響を示す S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 の同時発現に焦点を当てた。ヒト A P P N 末端抗体 2 2 C 1 1 でプロービングした、h A P P / h B A C E を発現する八工および h A P P / h B A C E / S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 を発現する八工の頭部ホモジネートのウェスタンプロットは、h A P P 完全長タンパク質の発現もベータ位切断も、S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 の同時発現によってもたらされないことを実証する (図 2 4 B) 。加えて、アミロイド形成性ペプチド A ベータの生成は、A ベータ N 末端特異的抗体 6 E 1 0 を用いた免疫沈降実験で実証される通り、S U L T 4 A 1 s v 1 を同時発現することによってもたらされない (図 2 3 B 参照) 。

【 0 1 0 8 】

h A P P / h B A C E 発現八工の網膜におけるアミロイド斑沈着は、プレセニリンの突然変異型の同時発現によって加速される (グリーブ (G r e e v e) ら , J . N e u r o s c i . 2 0 0 4 , 2 4 : 3 8 9 9 - 3 9 0 6) 。したがって、我々はチオフラビン S 陽性アミロイド斑の発生を、h A P P / h B A C E / D P s n 1 _ 2 3 5 P を発現する八工で調べ、および h A P P / h B A C E / D P s n 1 _ 2 3 5 P および S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 を発現する八工と比較した。図 2 5 に示す通り、対照八工と、S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 を同時発現する八工との間に、斑沈着の開始の時間に差は観察されなかった。このように、S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 の神経保護作用は、アルツハイマー病のこの非脊椎動物モデル系において、h A P P の発現およびアミロイド形成プロセッシングまたはアミロイド斑形成に依存しない。上記の通りの前記分析を図 2 3 、 2 4 および 2 5 に示す。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 0 9 】

【 図 1 】 図 1 は、蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ画面における S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の発現差の最初の特異性を開示する。図は、大調製用蛍光ディファレンシャル・ディスプレイゲルの切り抜きを示す。対照健常者 2 名および A D 患者 6 名の前頭皮質 (F) および側頭皮質 (T) に由来する P C R 産物を変性ポリアクリルアミドゲルに 2 連で負荷した (左から右へ) 。 P C R 産物は、対応する一塩基アンカーオリゴヌクレオチドおよび特異的 C y 3 標識化ランダムプライマーを用いた、個々の c D N A の増幅によって得られた。矢印は、前頭皮質に由来する S U L T 4 A 1 をコードする遺伝子の転写産物についてのシグナルの強度に、A D 患者の側頭皮質に由来するシグナルと比較して、および対照健常者と比較して、有意差が存在する移動位置を示す。その発現差は、A D 患者の前頭皮質と比較した、および非 A D 対照の側頭皮質と比較した、側頭皮質における S U L T 4 A 1 遺伝子転写のダウンレギュレーションを反映する。非 A D 対照健常者の側頭皮質および前頭皮質に由来するシグナルを互いに比較して、シグナル強度に差、すなわち発現レベルの変化は検出できない。

【 図 2 】 図 2 および 3 は、ヒト S U L T 4 A 1 遺伝子の、特に S U L T 4 A 1 スプライス変異体 1 および / または S U L T 4 A 1 スプライス変異体 2 の発現差を A D 脳組織において、定量 R T - P C R 分析によって図示する。A D 患者の前頭皮質 (F) および側頭皮質 (T) から採取した R N A 試料 (図 2 a) 、および A D 患者の前頭皮質 (F) および海馬 (H) に由来する試料 (図 3 a) からの R T - P C R 産物の定量は、ライトサイクラー (L i g h t C y c l e r) 迅速熱サイクリング法によって実施した。同様に、対応する年齢の対照健常者の試料を比較した (図 2 b は前頭皮質および側頭皮質、図 3 b は前頭皮質および海馬) 。データは、遺伝子発現レベルに有意差を示さなかった標準遺伝子の組の平均値の組み合わせについて正規化した。前記標準遺伝子の組は、シクロフィリン B 、リボソームタンパク質 S 9 、トランスフェリン受容体、G A P D H 、およびベータアクチンの遺伝子から成った。図は、蛍光によって測定された増幅された物質の量に対してサイクル数をプロットすることによって、増幅の動力学を示す。反応の指数期の間、対照健常者の前頭皮質および側頭皮質、および対照健常者の前頭皮質および海馬、のそれぞれ両方に由来する S U L T 4 A 1 スプライス変異体 1 および / または S U L T 4 A 1 スプライス変異体 2 c D N A の増幅動力学は並列しており (図 2 b および 3 b 、 矢印) 、一方、アルツハイマー病では (図 2 a および 3 a 、 矢印) 対応する曲線の有意な分離があり、分析した脳

10

20

30

40

50

領域のそれぞれでSULT4A1をコードする遺伝子の、特にSULT4A1スプライス変異体1および/またはSULT4A1スプライス変異体2の発現の差を示し、ヒトSULT4A1遺伝子の転写産物の、特にSULT4A1スプライス変異体1および/またはSULT4A1スプライス変異体2、またはその断片、または誘導體、または変異体の、側頭皮質において前頭皮質と相対的な、および海馬において前頭皮質と相対的な、調節障害、好ましくはダウンレギュレーションを示すことに注意する。

【図3】図2および3は、ヒトSULT4A1遺伝子の、特にSULT4A1スプライス変異体1および/またはSULT4A1スプライス変異体2の発現差をAD脳組織において、定量RT-PCR分析によって図示する。AD患者の前頭皮質(F)および側頭皮質(T)から採取したRNA試料(図2a)、およびAD患者の前頭皮質(F)および海馬(H)に由来する試料(図3a)からのRT-PCR産物の定量は、ライトサイクラー(LightCycler)迅速熱サイクリング法によって実施した。同様に、対応する年齢の対照健常者の試料を比較した(図2bは前頭皮質および側頭皮質、図3bは前頭皮質および海馬)。データは、遺伝子発現レベルに有意差を示さなかった標準遺伝子の組の平均値の組み合わせについて正規化した。前記標準遺伝子の組は、シクロフィリンB、リボソームタンパク質S9、トランスフェリン受容体、GAPDH、およびベータアクチンの遺伝子から成った。図は、蛍光によって測定された増幅された物質の量に対してサイクル数をプロットすることによって、増幅の動力学を示す。反応の指数期の間、対照健常者の前頭皮質および側頭皮質、および対照健常者の前頭皮質および海馬、のそれぞれ両方に由来するSULT4A1スプライス変異体1および/またはSULT4A1スプライス変異体2 cDNAの増幅動力学は並列しており(図2bおよび3b、矢印)、一方、アルツハイマー病では(図2aおよび3a、矢印)対応する曲線の有意な分離があり、分析した脳領域のそれぞれでSULT4A1をコードする遺伝子の、特にSULT4A1スプライス変異体1および/またはSULT4A1スプライス変異体2の発現の差を示し、ヒトSULT4A1遺伝子の転写産物の、特にSULT4A1スプライス変異体1および/またはSULT4A1スプライス変異体2、またはその断片、または誘導體、または変異体の、側頭皮質において前頭皮質と相対的な、および海馬において前頭皮質と相対的な、調節障害、好ましくはダウンレギュレーションを示すことに注意する。

【図4】図4および5は、ヒトSULT4A1遺伝子の発現差を、SULT4A1スプライス変異体1(SULT4A1sv1)について特異的に(図4)およびSULT4A1スプライス変異体2(SULT4A1sv2)について特異的に(図5)、AD脳組織において定量RT-PCR分析によって図示する。RT-PCR産物from AD患者の前頭皮質(F)および側頭皮質(T)から採取したRNA試料からのRT-PCR産物の定量(図4aおよび5a)は、ライトサイクラー(LightCycler)迅速熱サイクル法によって実施した。同様に、対応する年齢の対照健常者の試料を比較した(図4bおよび5b)。データは、遺伝子発現レベルに有意差を示さなかった標準遺伝子の組の平均値の組み合わせについて正規化した。前記標準遺伝子の組は、シクロフィリンB、リボソームタンパク質S9、トランスフェリン受容体、GAPDH、およびベータアクチンの遺伝子から成った。図は、蛍光によって測定された増幅された物質の量に対してサイクル数をプロットすることによって、増幅の動力学を示す。反応の指数期の間、対照健常者の前頭皮質および側頭皮質に由来するSULT4A1sv1 cDNAのおよびSULT4A1sv2 cDNAの増幅動力学はそれぞれ並列しており(図4bおよび5b、矢印)、一方、アルツハイマー病では(図4aおよび5a、矢印)対応する曲線の有意な分離があり、分析した脳領域のそれぞれでSULT4A1sv1(図4)およびSULT4A1sv2(図5)をコードする遺伝子の発現の差を示し、さらに、ヒトSULT4A1sv1およびSULT4A1sv2の転写産物の、側頭皮質において前頭皮質と相対的な、調節障害、好ましくはダウンレギュレーションを示すことに注意する。

【図5】図4および5は、ヒトSULT4A1遺伝子の発現差を、SULT4A1スプライス変異体1(SULT4A1sv1)について特異的に(図4)およびSULT4A1スプライス変異体2(SULT4A1sv2)について特異的に(図5)、AD脳組織に

10

20

30

40

50

において定量 R T - P C R 分析によって図示する。R T - P C R 産物 f r o m A D 患者の前頭皮質 (F) および側頭皮質 (T) から採取した R N A 試料からの R T - P C R 産物の定量 (図 4 a および 5 a) は、ライトサイクラー (L i g h t C y c l e r) 迅速熱サイクル法によって実施した。同様に、対応する年齢の対照健常者の試料を比較した (図 4 b および 5 b) 。データは、遺伝子発現レベルに有意差を示さなかった標準遺伝子の組の平均値の組み合わせについて正規化した。前記標準遺伝子の組は、シクロフィリン B、リボソームタンパク質 S 9、トランスフェリン受容体、G A P D H、およびベータアクチンの遺伝子から成った。図は、蛍光によって測定された増幅された物質の量に対してサイクル数をプロットすることによって、増幅の動力学を示す。反応の指数期の間、対照健常者の前頭皮質および側頭皮質に由来する S U L T 4 A 1 s v 1 c D N A のおよび S U L T 4 A 1 s v 2 c D N A の増幅動力学はそれぞれ並列しており (図 4 b および 5 b、矢印)、一方、アルツハイマー病では (図 4 a および 5 a、矢印) 対応する曲線の有意な分離があり、分析した脳領域のそれぞれで S U L T 4 A 1 s v 1 (図 4) および S U L T 4 A 1 s v 2 (図 5) をコードする遺伝子の発現の差を示し、さらに、ヒト S U L T 4 A 1 s v 1 および S U L T 4 A 1 s v 2 の転写産物の、側頭皮質において前頭皮質と相対的な、調節障害、好ましくはダウンレギュレーションを示すことに注意する。

【図 6】図 6 および 7 は、98% 信頼レベルでの中央値の統計手法を用いた、対照および A D 病期の比較による、S U L T 4 A 1 s v 1 および / または S U L T 4 A 1 s v 2 の (図 6) および特異的に S U L T 4 A 1 s v 1 の (図 7) 絶対 m R N A 発現の分析を示す。データは、ブラーク病期 0 から 1、ブラーク病期 0 から 2、またはブラーク病期 0 から 3 のいずれかの被験者を含む対照群を定義することによって計算し、ブラーク病期 2 から 6、ブラーク病期 3 から 6 およびブラーク病期 4 から 6 をそれぞれ含む定義された A D 患者群について計算されたデータと比較する。加えて、ブラーク病期 0 から 1、ブラーク病期 2 から 3 およびブラーク病期 4 から 6 のどれかの被験者をそれぞれ含む 3 群を互いに比較した。A D 患者のおよび対照者の前頭皮質 (F) と下側頭皮質 (T) を互いに比較して有意差が検出された。前記の差は、A D 患者の側頭皮質における、対照者の側頭皮質と相対的な S U L T 4 A 1 の強いダウンレギュレーション、および A D 患者の側頭皮質における、A D 患者の前頭皮質と比較した S U L T 4 A 1 のダウンレギュレーションを反映する。その差はまた、A D 患者の前頭皮質における、対照群被験者の前頭皮質と比較した S U L T 4 A 1 のダウンレギュレーションを反映する。ブラーク病期は A D 疾患の進行過程と相

関し、進行過程は本発明で示す通り、S U L T 4 A 1 の調節、レベルおよび活性の漸増する差と上記の通り関連する。前記の有意差は、ブラーク病期 3 ですすでに観察された。

【図 7】図 6 および 7 は、98% 信頼レベルでの中央値の統計手法を用いた、対照および A D 病期の比較による、S U L T 4 A 1 s v 1 および / または S U L T 4 A 1 s v 2 の (図 6) および特異的に S U L T 4 A 1 s v 1 の (図 7) 絶対 m R N A 発現の分析を示す。データは、ブラーク病期 0 から 1、ブラーク病期 0 から 2、またはブラーク病期 0 から 3 のいずれかの被験者を含む対照群を定義することによって計算し、ブラーク病期 2 から 6、ブラーク病期 3 から 6 およびブラーク病期 4 から 6 をそれぞれ含む定義された A D 患者群について計算されたデータと比較する。加えて、ブラーク病期 0 から 1、ブラーク病期 2 から 3 およびブラーク病期 4 から 6 のどれかの被験者をそれぞれ含む 3 群を互いに比較した。A D 患者のおよび対照者の前頭皮質 (F) と下側頭皮質 (T) を互いに比較して有意差が検出された。前記の差は、A D 患者の側頭皮質における、対照者の側頭皮質と相対的な S U L T 4 A 1 の強いダウンレギュレーション、および A D 患者の側頭皮質における、A D 患者の前頭皮質と比較した S U L T 4 A 1 のダウンレギュレーションを反映する。その差はまた、A D 患者の前頭皮質における、対照群被験者の前頭皮質と比較した S U L T 4 A 1 のダウンレギュレーションを反映する。ブラーク病期は A D 疾患の進行過程と相

関し、進行過程は本発明で示す通り、S U L T 4 A 1 の調節、レベルおよび活性の漸増する差と上記の通り関連する。前記の有意差は、ブラーク病期 3 ですすでに観察された。

【図 8】図 8 は、配列番号 1、すなわち 284 アミノ酸を含むヒト S U L T 4 A 1 スプライス変異体 1 (G e n b a n k 登録番号 0 4 3 7 2 8) のアミノ酸配列を開示する。

10

20

30

40

50

【図9】図9は、配列番号2、すなわち171アミノ酸を含むヒトSULT4A1スプライス変異体2のポリペプチド配列を開示する。タンパク質SULT4A1スプライス変異体2は、配列番号1(Genbank登録番号043728)の114アミノ酸(アミノ酸57から170)を欠き、および配列番号2の57位に追加のアミノ酸を有する点で、SULT4A1スプライス変異体1と異なる。

【図10】図10は、配列番号3、すなわち2419ヌクレオチドを含むヒトSULT4A1cDNAスプライス変異体1(Genbank登録番号AF176342)のヌクレオチド配列を表す。

【図11】図11は、配列番号4、すなわち2080ヌクレオチドを含むヒトSULT4A1cDNAスプライス変異体2(Genbank登録番号AF176342、EST 10
bi550483およびbm805353で表されるヌクレオチド190から528を欠く)のヌクレオチド配列を表す。

【図12】図12は、配列番号5、すなわち、蛍光ディファレンシャル・ディスプレイおよび続いてのクローニングによって特定されおよび得られた、32bpのSULT4A1cDNA断片のヌクレオチド配列を示す(5'から3'方向の配列)。

【図13】図13は、配列番号6のヌクレオチド配列、すなわち、855ヌクレオチドを含み配列番号3のヌクレオチド21から875を有する、ヒトSULT4A1遺伝子のコード配列(cds)を示す。

【図14】図14は、配列番号5すなわち32bpのヒトSULT4A1cDNA断片の、ヒトSULT4A1スプライス変異体1cDNA(Genbank登録番号AF176 20
342、配列番号3、ヌクレオチド2335から2366)およびSULT4A1スプライス変異体2cDNA(配列番号4、ヌクレオチド1996から2027)のヌクレオチド配列との配列整列の概要を示す。

【図15】図15および16は、内部参照番号P010、P011、P012、P014、P016、P017、P019、P038、P040、P041、P042、P046、P047、P048、P049(SULT4A1sv1および/またはsv2について1.27~7.14倍、およびSULT4A1sv1単独について1.10~16.67倍;下記の式に従った逆数値)で特定されるAD患者15名、および内部参照番号C005、C008、C011、C012、C014、C025、C026、C027、C028、C029、C030、C031、C032、C033、C034、C035、C03 30
6、C038、C039、C041、C042、DE02、DE03、DE05、DE07(SULT4A1sv1および/またはsv2について0.42~2.5倍、およびSULT4A1sv1単独について2.89~3.33倍;下記の式に従った逆数値)で特定される対応する年齢の対照者25名での、側頭皮質における前頭皮質と相対的なSULT4A1sv1および/またはSULT4A1sv2の発現レベル(図15)および特にSULT4A1sv1の発現レベル(図16)を列記する。それぞれ、側頭皮質におけるアップレギュレーションについては、表示の数値は本明細書に記載の式(下記参照)に従って計算し、および前頭皮質におけるアップレギュレーションの場合は、逆数値を計算した。棒グラフは、異なるブランク病期(0から6)における側頭皮質の前頭皮質に対する自然対数値 $\ln(IT/IF)$ 、および側頭皮質調節因子に対する前頭皮質の自然体数値 40
 $\ln(IF/IT)$ を視覚化する。

【図16】図15および16は、内部参照番号P010、P011、P012、P014、P016、P017、P019、P038、P040、P041、P042、P046、P047、P048、P049(SULT4A1sv1および/またはsv2について1.27~7.14倍、およびSULT4A1sv1単独について1.10~16.67倍;下記の式に従った逆数値)で特定されるAD患者15名、および内部参照番号C005、C008、C011、C012、C014、C025、C026、C027、C028、C029、C030、C031、C032、C033、C034、C035、C036、C038、C039、C041、C042、DE02、DE03、DE05、DE0 50
7(SULT4A1sv1および/またはsv2について0.42~2.5倍、およびS

U L T 4 A 1 s v 1 単独について 2.89 ~ 3.33 倍 ; 下記の式に従った逆数値) で特定される対応する年齢の対照者 25 名での、側頭皮質における前頭皮質と相対的な S U L T 4 A 1 s v 1 および / または S U L T 4 A 1 s v 2 の発現レベル (図 15) および特に S U L T 4 A 1 s v 1 の発現レベル (図 16) を列記する。それぞれ、側頭皮質におけるアップレギュレーションについては、表示の数値は本明細書に記載の式 (下記参照) に従って計算し、および前頭皮質におけるアップレギュレーションの場合は、逆数値を計算した。棒グラフは、異なるブランク病期 (0 から 6) における側頭皮質の前頭皮質に対する自然対数値 $\ln (I T / I F)$ 、および側頭皮質調節因子に対する前頭皮質の自然体数値 $\ln (I F / I T)$ を視覚化する。

【図 17】図 17 は、S U L T 4 A 1 遺伝子 (スプライス変異体 1 および / またはスプライス変異体 s v 2) について、内部参照番号 P 0 1 0、P 0 1 1、P 0 1 2、P 0 1 4、P 0 1 6、P 0 1 9 (0.13 から 1.37 倍) で特定されるアルツハイマー病患者 6 名、および内部参照番号 G 0 0 4、C 0 0 5、C 0 0 8 (0.56 から 0.82 倍) で特定される対応する年齢の対照者 3 名における、海馬における前頭皮質と相対的な遺伝子発現レベルを列記する。表示の数値は本明細書に記載の式 (下記参照) に従って計算される。散布図は、それぞれ対照試料 (点) における、および A D 患者試料 (三角) における、前頭皮質に対する海馬の調節比の個々の対数値 ($\log (\text{比} H C / I F)$) を視覚化する。

【図 18】図 18 は、H 4 A P P s w 対照細胞および m y c - タグ化 S U L T 4 A 1 タンパク質を安定に過剰発現する H 4 A P P s w 細胞 (H 4 A P P s w - S U L T 4 A 1 - m y c) の免疫蛍光分析を示す。S U L T 4 A 1 - m y c タンパク質は、ウサギ抗 m y c 抗体 (モビテック (M o b i t e c)) および C y 3 結合抗ウサギ抗体 (アマシャム (A m e r s h a m)) を用いて検出した (図 18 A および B)。細胞核は D A P I で染色した (図 18 C および D)。オーバーレイ分析は、S U L T 4 A 1 - m y c タンパク質は細胞質に局在し (図 18 E)、および H 4 A P P s w 対照細胞と比較して H 4 A P P s w - S U L T 4 A 1 - m y c 形質導入細胞の 50 % より多くで過剰発現されることを示す (図 18 F)。

【図 19】図 19 は、S U L T 4 A 1 - m y c タンパク質の過剰発現が、H 4 - A P P s w 細胞を H 4 A P P s w 対照細胞よりも、栄養因子欠乏に高耐性にすることを示す。両方の細胞型は、0 から 7.5 % の範囲の血清濃度を含む細胞培地中で 40 時間インキュベートされている。栄養因子欠乏への細胞応答は、酸化還元指示薬アラマーブルー (A l a m a r B l u e) (バイオソース (B i o S o u r c e)) を用いおよび相対蛍光 (R F U) を測定することによって判定した。% 毒性は下記に示す式に従って計算した (実施例 (v i))。グラフは、2 回の独立した実験から得られた毒性計算の平均値を表す。

【図 20】図 20 は、S U L T 4 A 1 欠損 (ノックアウト) マウスを作製するために用いられたターゲティング戦略を模式的に示す。マウス S u l t 4 A 1 遺伝子は、ローマ数字 (I ~ V I I) 付きの四角で示す 7 個のエクソンから成る。ターゲティングベクターは、約 2.9 k b の短ホモロジーマ配列 (S A) および約 7 k b の長ホモロジーマ配列 (L A) から成る。N e o カセット (P g k プロモーターによって動作するネオマイシン耐性遺伝子) がエクソン 2 に挿入され、S u l t 4 A 1 遺伝子のエクソン 2 およびエクソン 3、4 および 5 の主要部分を置換する。N e o 選択マーカーは、F R T 部位 (F L P リコンビナーゼの認識部位) に隣接され、必要に応じて、N e o カセットの F L P リコンビナーゼ (部位特異的リコンビナーゼ) による除去を可能にする。N e o カセットの 3' 位で、スプライス受容体およびポリ A シグナル配列 (p A) が、選択マーカーが除去された際に転写産物の終止を保証する。P g k (構成性マウスホスホグリセリン酸キナーゼ - 1 プロモーター)、N e o (ネオマイシン耐性遺伝子、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ)

【図 21】図 21 は、ヒト S u l t 4 A 1 を発現する遺伝子導入マウスを作製するために用いられたターゲティング戦略を模式的に示す。ターゲティングベクターは、導入遺伝子を R o s a 2 6 遺伝子座 (マウス R o s a ベータ g e o 2 6 遺伝子) へ組み込むために、導入遺伝子および R o s a 2 6 ホモロジーマ配列から成る。短ホモロジーマ配列 (

S A) は約 1 . 1 k b から成り、長ホモロジーアーム配列 (L A) は約 4 . 3 k b から成る。R o s a 2 6 遺伝子の 3 個のエクソンをローマ数字 (I ~ I I I) で示す。導入遺伝子は、脳特異的 T h y 1 . 2 遺伝子の調節配列を含むマウス T h y 1 . 2 発現カセットに位置するヒト S u l t 4 A 1 (O R F S U L T 4 A 1) のオープン・リーディング・フレームから成る。導入遺伝子の 5 ' 端にネオマイシン耐性遺伝子 (N e o) およびスプライス受容体が位置し、内因性 R o s a 2 6 遺伝子由来の R o s a プロモーターによって動作する N e o 選択マーカの発現を可能にする。N e o マーカの 3 ' 端のポリ A シグナル (p A) が転写を停止する。

【図 2 2】図 2 2 は、3 つの異なる S U L T 4 A 1 s v 1 遺伝子導入ハ工系統における、g m r - G A L 4 の調節下にある S U L T 4 A 1 s v 1 発現の検出を、S U L T 4 A 1 s v 1 特異的プライマーを用いた R T - P C R によって示す。使用した遺伝子型は：w ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 / g m r - G A L 4 ; w ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 8 / g m r - G A L 4 ; w ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 2 2 / + ; g m r G A L 4 / + 。野生型および S U L T 4 A 1 s v 1 発現ハ工の R T - P C R 産物の融点を図 2 2 A に図示する。図 2 2 B は、3 つの異なる S U L T 4 A 1 s v 1 発現ハ工系統の発現効率の比較を示す。効率はサイクル数、および S U L T 4 A 1 スプライス変異体 1 特異的プライマー対の R T - P C R 反応の効率に従って計算する。測定は各遺伝子型について 3 連で実施した。使用した遺伝子型は：w ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 / g m r - G A L 4 ; w ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 8 / g m r - G A L 4 ; w ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 2 2 / + ; g m r - G A L 4 / + 。

【図 2 3】S U L T 4 A 1 は、g m r - G A L 4 の調節下にある h A P P および h B A C E を発現するハ工において光受容体細胞変性を救済する。10 μ m クリオスタット (C r y o s t a t) 成体脳切片を、光受容体細胞特異的抗体 2 4 B 1 0 を用いて、羽化の 3、8、16 および 19 日後に染色した。S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 (図 2 3 A) および S U L T 4 A 1 s v 1 # 8 (図 2 3 B) の発現は、網膜の直径 (白矢印) によって判定される通り光受容体細胞変性を救済し、一方、S U L T 4 A 1 s v 1 # 2 2 は変性表現型に対して効果を示さなかった (図 2 3 C) 。g m r - G A L 4 の調節下にある S U L T 4 A 1 s v 1 # 3、# 8 および # 2 2 だけの発現は野生型である (図 2 3 A、B および C の左列) 。使用した表現型は：w ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 / g m r - G A L 4 - w ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 8 / g m r - G A L 4 - w ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 2 2 / + ; g m r - G A L 4 / + - w ; U A S - h B A C E、U A S - h A P P / + ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 / g m r - G A L 4 - w ; U A S - h B A C E、U A S - h A P P / + ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 8 / g m r - G A L 4 - w ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 2 2 / h A P P、h B A C E ; g m r - G A L 4 / + ; R e : 網膜 ; L a : 薄層 ; M e : 髄質。

【図 2 4】図 2 4 は、h A P P / h B A C E または S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 と組み合わせて発現しているハ工の頭部ホモジネートのウェスタンプロットを図示する (図 2 4 A) 。各レーンには等量のタンパク質が負荷された。プロットは抗 h A P P N 末端特異的抗体 2 2 C 1 1 を用いてプロービングした。抗体は h A P P の完全長および A ベータ切断 N 末端断片を検出する。ウェスタンプロット上での沈降および検出のための A ベータ N 末端特異的抗体 6 E 1 0 を用いた免疫沈降を図 2 4 B に示す。A ベータペプチドは主にオリゴマー型で検出される。

【図 2 5】h A P P / h B A C E / D P s n l _ 2 3 5 P または h A P P / h B A C E / D P s n l 2 3 5 P / S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 (星印で表示) を発現するハ工の網膜を通るパラフィン切片上のチオフラビン S 陽性斑。対照ハ工と h A P P / h B A C E / D P s n l _ 2 3 5 P / S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 発現ハ工の間に斑形成の開始に差は検出されなかった、w ; U A S - h B A C E、U A S - h A P P / + ; g m r - G A L 4、U A S - D P s n l 2 3 5 P / + および w ; U A S - h B A C E、U A S - h A P P / + ; U A S - S U L T 4 A 1 s v 1 # 3 / g m r - G A L 4、U A S - D p s n l 2 3 5 P 。

【 図 8 】

図 8 : 配列番号 1 :
ヒトSULT4A1タンパク質
スプライス変異体 1 のアミノ酸配列

長さ : 284アミノ酸

1 MAESEAETPS TPGEFESKYF EFHGVRLPPF CRGMEEIAN FVVRPSDVWI
51 VTYPKSCTSL LQEVVYLVSQ GADPDEIGLM NIDEQLPVLV YPQPGLDIIK
101 ELTSPRLIKS HLPYRFLPSD LHNHGDVKIYI MARNPKLDLIV SYQFHRSLR
151 TMSYRGTFOE FCRREFMNDKL GYGSWFHEVQ EFWEHRMDSN VLFLKYEDMH
201 RDLVIMVEQL ARFLGVSDCK AQLLEALTEHC HQLVLDCCNA EALPVGRGRV
251 GLWKDIFTVS MNEKFDLVYK QRMKGCCLDFL DFYLV

【 図 9 】

図 9 : 配列番号 2 :
ヒトSULT4A1タンパク質
スプライス変異体 2 のアミノ酸

長さ : 171アミノ酸

1 MAESEAETPS TPGEFESKYF EFHGVRLPPF CRGMEEIAN FVVRPSDVWI
51 VTYPKSVGYG SWFEHVQEFW EHRMDSNVLF LKYEDMHRDL VTMVEQLARF
101 LGVSCDKAQL EALTEHCHQL VDQCENAEAL FVGRGRVGLW KDIFTVSMNE
151 KFDLVYKQKM GRKCLDFDFY L

【 図 1 1 】

図 11 : 配列番号 4 :
ヒトSULT4A1cDNA
スプライス変異体 2 のヌクレオチド配列

長さ : 2080 bp

1 GGGACGGCGA CGCGGGCGGC ATGGCGGAGA GCGAGGCCGA GACCCCCAGC
51 ACCCCGGGGG ASCTCGAGAG CAATGACTTC GAGTTCATG CGCTGGGGCT
101 GCGCCCTTC TGCCCGGGGA AGATGAGAGA GATCGCCAC TCCCGGGTGC
151 GGGCCAGCGA CGTGTGGATC GTCACTACCC CCAAGTCCCG GGGCTAGCGC
201 TCTGGTGTG AGCAGCGACA GAGTCTGCG GAGCAGCGCA TGGACTGGAA
251 CGTCTTTTTC CTCAGTAIAG AAGAGATGCA TCGGAGCTGC CTGAGATGAG
301 TGGAGCAGCT GCGCAGATTC CTGGGGTGTG CCGTGCACAA GCGCCAGCTG
351 GARGCCCTGA CCGAGCACTG CCACCAGCTG GTGGACCAGT GCTGCACAGC
401 TGAGGCCCTG CCGCTGGGCG GCGAGAGAGT TGGGCTGTGG AAGGACATCT
451 TCACCGTCTC CATGAATGAG AAGTTGACT TGGTGTATAA ACAGAGATG
501 GGAAGGTGTG ACCTCAGGTT TGCTTTTAT TATAATAAAC AAGAACACAA
551 ACCTGCATGC TCACAAATCC CAGACAGTCT ACTAGCCAAA AGTCCGTGAT
601 GCATTCATTT ATTCCTGTCT GGACAAATCT TGGAGCAGCG GTGTCGAAAC
651 CCGGGGGAAG GGAAGAGCGG CBTGAGCCGA GGGAGTGTGA TGATTCCCAA
701 CCGAAGCAGC TGCTTCGCTT TTAGAACGTC CAGCCCTCCG ATATCTGAT
751 ACAARACGTC TCCACATGCG AGTTCCAAAT GCTTGGACCG TAAGGATAAA
801 GCCTGTATAA TATGCAACTA GAATGTCTGC CTTTTCAACC CCGTACTTAT
851 GTATTTTATA GAGCTTTTCA CTGGAAATCT ACATAAATGT CAGTAAACCA
901 AATAAAGTTC CATTTCGAAG GGAATCAGG AGCGAGCCAC ACCCGAATGG
951 TAGAAAGATC TCAGGTTAA CTCTTTATTT TTGTAGTTTT ATTACTAAG
1001 GCACAGCCAT TCTGTCTTCA CTGGTCTTGT AGATAGTGGT GAGACACAGG
1051 GATGAGTTGG TCTGTGTGG GGGAACTCTG ACACCTGTGT ATTCTGACGG
1101 AGTTCACCTC TTCAGAAATC TCCGTAAATG AGCAGAAATG GTTCACTAGG
1151 TCTTCAGAAAT GAGCTCTTCT CTGGCAGAGA CTCACAGCGG GCGGCTCCAA
1201 AGGCCCAATG CAGAGGAGCC CCGCGAGGAT GTGCTGAGGG AAGTCTGCCT
1251 GGTGAGGCTG CAGCTGAGCA CTCTAATGCA GTCAGGAGCA TTTGCATGCA
1301 CTGGTGGAG AGTGGGCCAC CAAGGAGCGG AGTTCGCTC GGAATTTGAG
1351 CTGAATTTCA CAGCCCTACT TGTGTTCCG AAGTGAATAG CTACTAATGC
1401 TGGCAAGCAG ATGCTTAATA GTAAATTTCT AAAATCCCGG GTTCTTTATC
1451 ATTCAAGTTG TCTGTGCAC CTGAGCCGCT CAGCCGTGGG AGGACCATTT
1501 TGGGAGTGTG GGTCTGAAAT CACTGAGTCA GGTGTGACAG GCGGCTGTGG
1551 TGTCTGTCCA CCTCATCTCT CCGTGTATCT GAGGAGATAA AGTGGAGTTC
1601 TTTATTTGCT CACTGCTTAA TTTTCTCACC CACTATTCCT GAGCGATGG
1651 AGAGTGGGGC GCTGTGTGGC AGCCAAACCC GTGGGAGCGG GGTGTGCTGG
1701 TCAATTTATG GGTCTGAAAG CACCCAAAGT GGTGGTCAAG AGGCTGTGG
1751 CTGTGGAAAG GGTCTGCTGT CTGGTGTGCT TACTTGAAC GGTGTGAGAG
1801 AAGAGCTTGT GTTTTGTCTT GTAAATGGGA GAAGCGTGGC CAGGCGGGT
1851 GCAAGTGGCA TGCATAGGTC GGTCTGGCAG CACCTGTGCT GTTTTCTGT
1901 GAGGGAGGCT GCTTTCTGTG AAATTTCAAT TATATTTTCT TATTTTATG
1951 ACTGTATGGA TGTACTGTAG CACTACACAT GACCTCTCTG TGCCTGTGG
2001 CATCTTTAAT AAGACATGT TCCGGGCTT GCAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
2051 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

【 図 1 0 】

図 1 0 : 配列番号 3 :
ヒトSULT4A1 cDNA
スプライス変異体 1 のヌクレオチド配列

長さ : 2419 bp

1 GGGACGGCGA CGCGGGCGGC ATGGCGGAGA GCGAGGCCGA GACCCCCAGC
51 ACCCCGGGGG AGTTCGAGAG CAATGACTTC GAGTTCATG CGCTGGGGCT
101 GCGCCCTTC TGCCCGGGGA AGATGAGAGA GATCGCCAC TCCCGGGTGC
151 GGGCCAGCGA CGTGTGGATC GTCACTACCC CCAAGTCCCG GGGCTAGCGC
201 TCTGGTGTG AGCAGCGACA GAGTCTGCG GAGCAGCGCA TGGACTGGAA
251 CGTCTTTTTC CTCAGTAIAG AAGAGATGCA TCGGAGCTGC CTGAGATGAG
301 TGGAGCAGCT GCGCAGATTC CTGGGGTGTG CCGTGCACAA GCGCCAGCTG
351 GARGCCCTGA CCGAGCACTG CCACCAGCTG GTGGACCAGT GCTGCACAGC
401 TGAGGCCCTG CCGCTGGGCG GCGAGAGAGT TGGGCTGTGG AAGGACATCT
451 TCACCGTCTC CATGAATGAG AAGTTGACT TGGTGTATAA ACAGAGATG
501 GGAAGGTGTG ACCTCAGGTT TGCTTTTAT TATAATAAAC AAGAACACAA
551 ACCTGCATGC TCACAAATCC CAGACAGTCT ACTAGCCAAA AGTCCGTGAT
601 GCATTCATTT ATTCCTGTCT GGACAAATCT TGGAGCAGCG GTGTCGAAAC
651 CCGGGGGAAG GGAAGAGCGG CBTGAGCCGA GGGAGTGTGA TGATTCCCAA
701 CCGAAGCAGC TGCTTCGCTT TTAGAACGTC CAGCCCTCCG ATATCTGAT
751 ACAARACGTC TCCACATGCG AGTTCCAAAT GCTTGGACCG TAAGGATAAA
801 GCCTGTATAA TATGCAACTA GAATGTCTGC CTTTTCAACC CCGTACTTAT
851 GTATTTTATA GAGCTTTTCA CTGGAAATCT ACATAAATGT CAGTAAACCA
901 AATAAAGTTC CATTTCGAAG GGAATCAGG AGCGAGCCAC ACCCGAATGG
951 TAGAAAGATC TCAGGTTAA CTCTTTATTT TTGTAGTTTT ATTACTAAG
1001 GCACAGCCAT TCTGTCTTCA CTGGTCTTGT AGATAGTGGT GAGACACAGG
1051 GATGAGTTGG TCTGTGTGG GGGAACTCTG ACACCTGTGT ATTCTGACGG
1101 AGTTCACCTC TTCAGAAATC TCCGTAAATG AGCAGAAATG GTTCACTAGG
1151 TCTTCAGAAAT GAGCTCTTCT CTGGCAGAGA CTCACAGCGG GCGGCTCCAA
1201 AGGCCCAATG CAGAGGAGCC CCGCGAGGAT GTGCTGAGGG AAGTCTGCCT
1251 GGTGAGGCTG CAGCTGAGCA CTCTAATGCA GTCAGGAGCA TTTGCATGCA
1301 CTGGTGGAG AGTGGGCCAC CAAGGAGCGG AGTTCGCTC GGAATTTGAG
1351 CTGAATTTCA CAGCCCTACT TGTGTTCCG AAGTGAATAG CTACTAATGC
1401 TGGCAAGCAG ATGCTTAATA GTAAATTTCT AAAATCCCGG GTTCTTTATC
1451 ATTCAAGTTG TCTGTGCAC CTGAGCCGCT CAGCCGTGGG AGGACCATTT
1501 TGGGAGTGTG GGTCTGAAAT CACTGAGTCA GGTGTGACAG GCGGCTGTGG
1551 TGTCTGTCCA CCTCATCTCT CCGTGTATCT GAGGAGATAA AGTGGAGTTC
1601 TTTATTTGCT CACTGCTTAA TTTTCTCACC CACTATTCCT GAGCGATGG
1651 AGAGTGGGGC GCTGTGTGGC AGCCAAACCC GTGGGAGCGG GGTGTGCTGG
1701 TCAATTTATG GGTCTGAAAG CACCCAAAGT GGTGGTCAAG AGGCTGTGG
1751 CTGTGGAAAG GGTCTGCTGT CTGGTGTGCT TACTTGAAC GGTGTGAGAG
1801 AAGAGCTTGT GTTTTGTCTT GTAAATGGGA GAAGCGTGGC CAGGCGGGT
1851 GCAAGTGGCA TGCATAGGTC GGTCTGGCAG CACCTGTGCT GTTTTCTGT
1901 GAGGGAGGCT GCTTTCTGTG AAATTTCAAT TATATTTTCT TATTTTATG
1951 ACTGTATGGA TGTACTGTAG CACTACACAT GACCTCTCTG TGCCTGTGG
2001 CATCTTTAAT AAGACATGT TCCGGGCTT GCAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
2051 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

【 図 1 2 】

図 12 : 配列番号 5 :

長さ : 32 bp

1 GATTGCATCT TTAATAAGA CATGTTCCCG GC

【 図 1 3 】

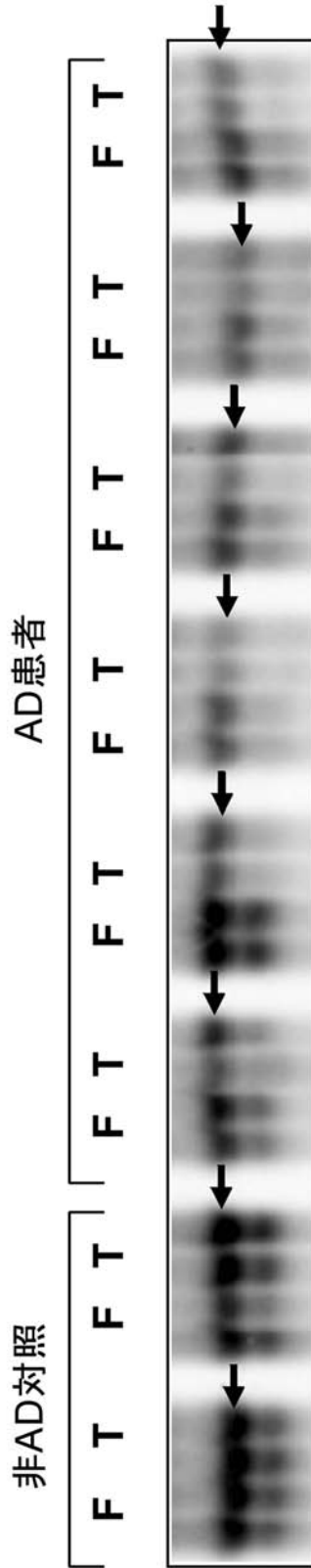
図 13 : 配列番号 6 :
ヒトSULT4A1コード配列のヌクレオチド配列

長さ : 855 bp

1 ATGGCGGAGA GCGAGGCCGA GACCCCCAGC ACCCCGGGGG AGTTCGAGAG
51 CAAGTACTTC GAGTTCATG CGCTGGGGCT GCGGCCCTTC TGCCGGGGGA
101 AGATGGAGGA GATCGCCAAC TCCCGGGTGC GGGCCAGCGA CBTGTGGATC
151 GTCACCTACC CCAAGTCCCG CACCAAGTTG CTCGAGGAGG TGGTCTACTT
201 GGTGAGCCAG GGGGCTGACC CCGATGAGAT GGGCTGTGAT AACATCGACG
251 AGCAGCTCCC GTTCTGAGG TACCACAGC CCGGCTGGA CATCATCAAG
301 GAACCTGACT CTCGCCGCTC CATCAAGAGC CACTGCGCTT ACCGCTTCTT
351 GCCTCTGAC CTCACCAATG GAGACTCCAA GGTCTACTAT ATGGCTCCGA
401 ACCCAAAGGA TCTGGTGGTG TCTTTATTTA AGTTCACCCG AGTTCGCGG
451 ACCATGAGCT ACCGAGGCAC CTTTCAAGAA TTTCCGCGGA GGTTTATGAA
501 TGATAAGCTG GGCTACGGCT CCGTGTTTGA GGCAGTGCAG GAGTCTGGG
551 AGCAGCCGAT GGACTCGAAC GTGCTTTTTC TCAAGTATGA AGCATGTAT
601 CCGGACCTGG TGACCATGGT GGAGCAGCT GGCAGATTC CCGGGGTGTC
651 CTGTGACAGG GCCAGCTGG AAGCCGTGAC GGAGCAGCTG CACCAAGTGG
701 TGGACCAAGT CTGCAACGCT GAGGCGCTCG CCGTGGGCGG GAGGAGGAT
751 GGGCTCTGGA AGGACATCTT CACCTGTCCA ATGAATGAGA AGTTTACTTT
801 GGTGTATAAA CAGAGATGG GAAAGTGTCA CCTCAGCTTT GACTTTTAT
851 TATAAA

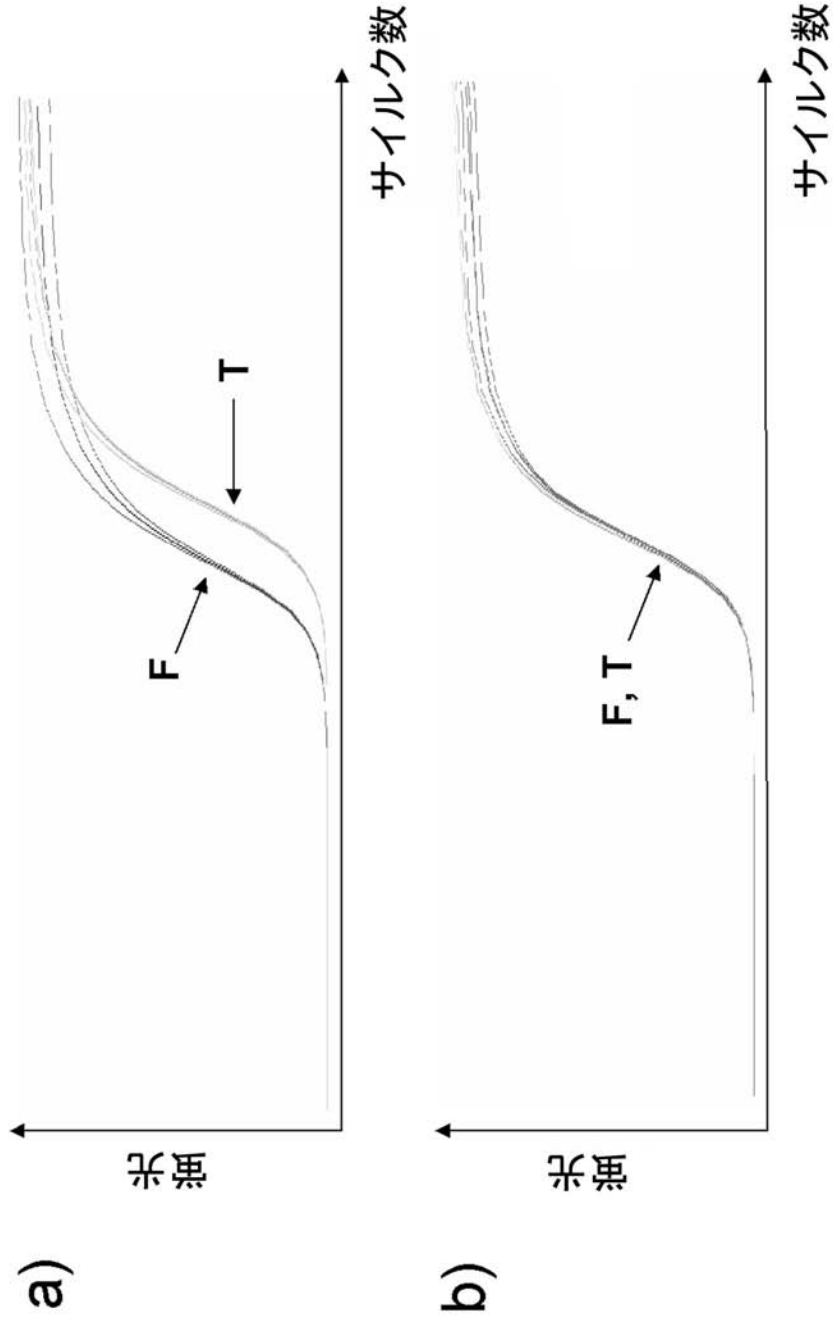
【 図 1 】

図1: 蛍光ディスプレイ・ディスプレイ画面における発現に差のある遺伝子の特定



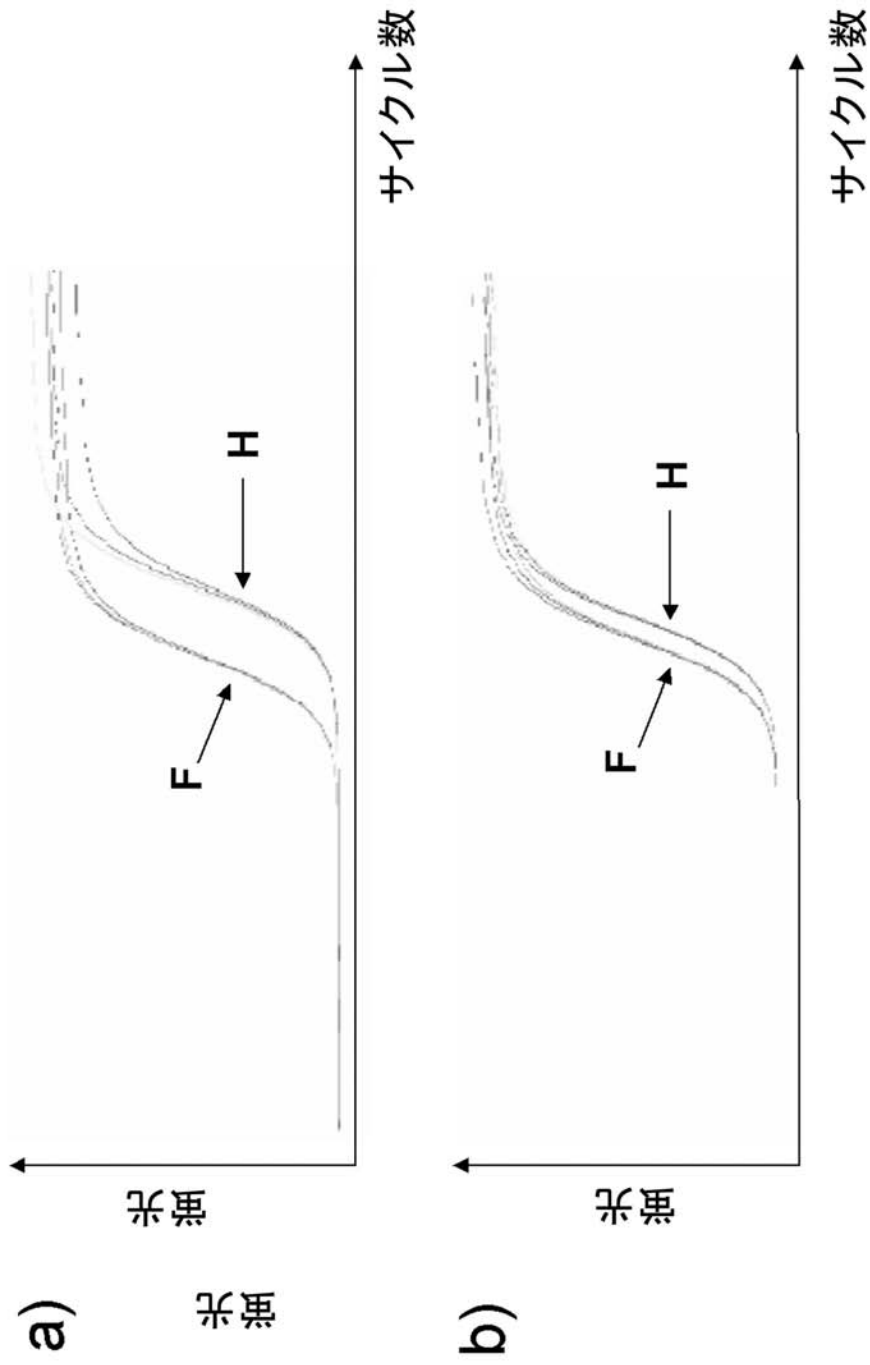
【 図 2 】

図2: SULT4A1 スプライス変異体1および/またはスプライス変異体2の発現差の定量RT-PCR分析による検証

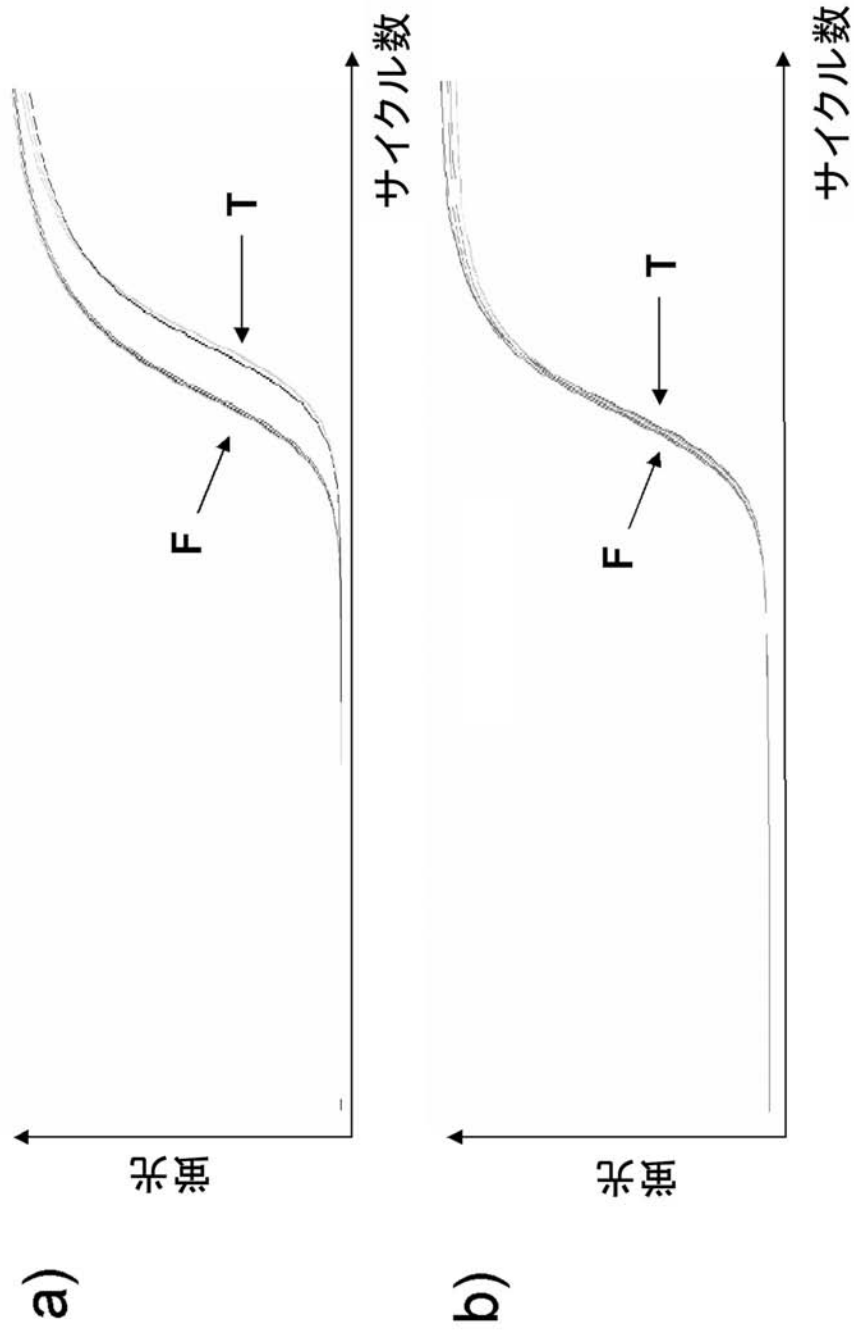


【 図 3 】

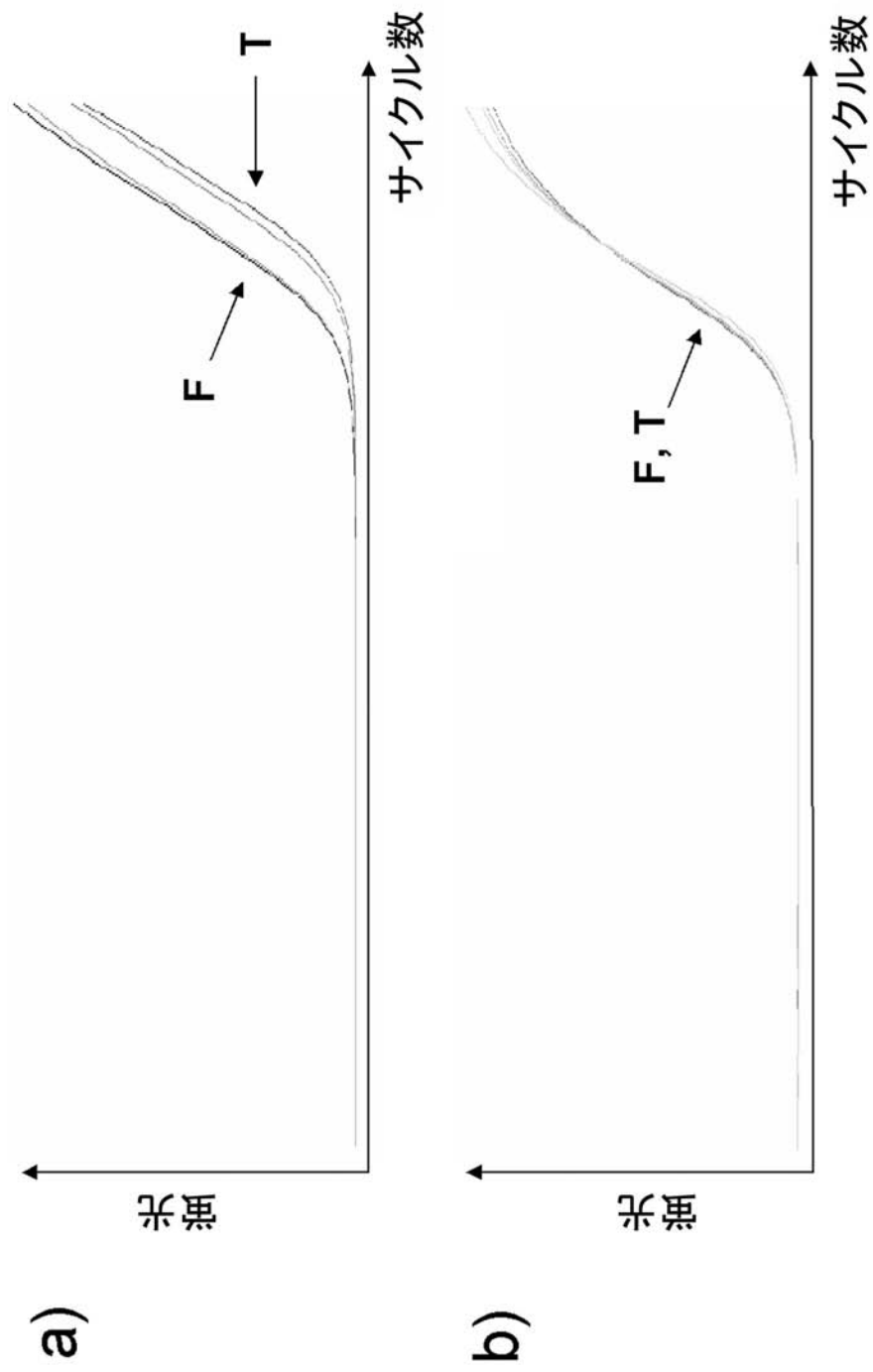
図3: SULT4A1スプライス変異体1および/またはスプライス変異体2の発現差の定量RT-PCR分析による検証



【 図 4 】
図4: SULT4A1スプライス変異体1の発現差の定量RT-PCR分析による検証

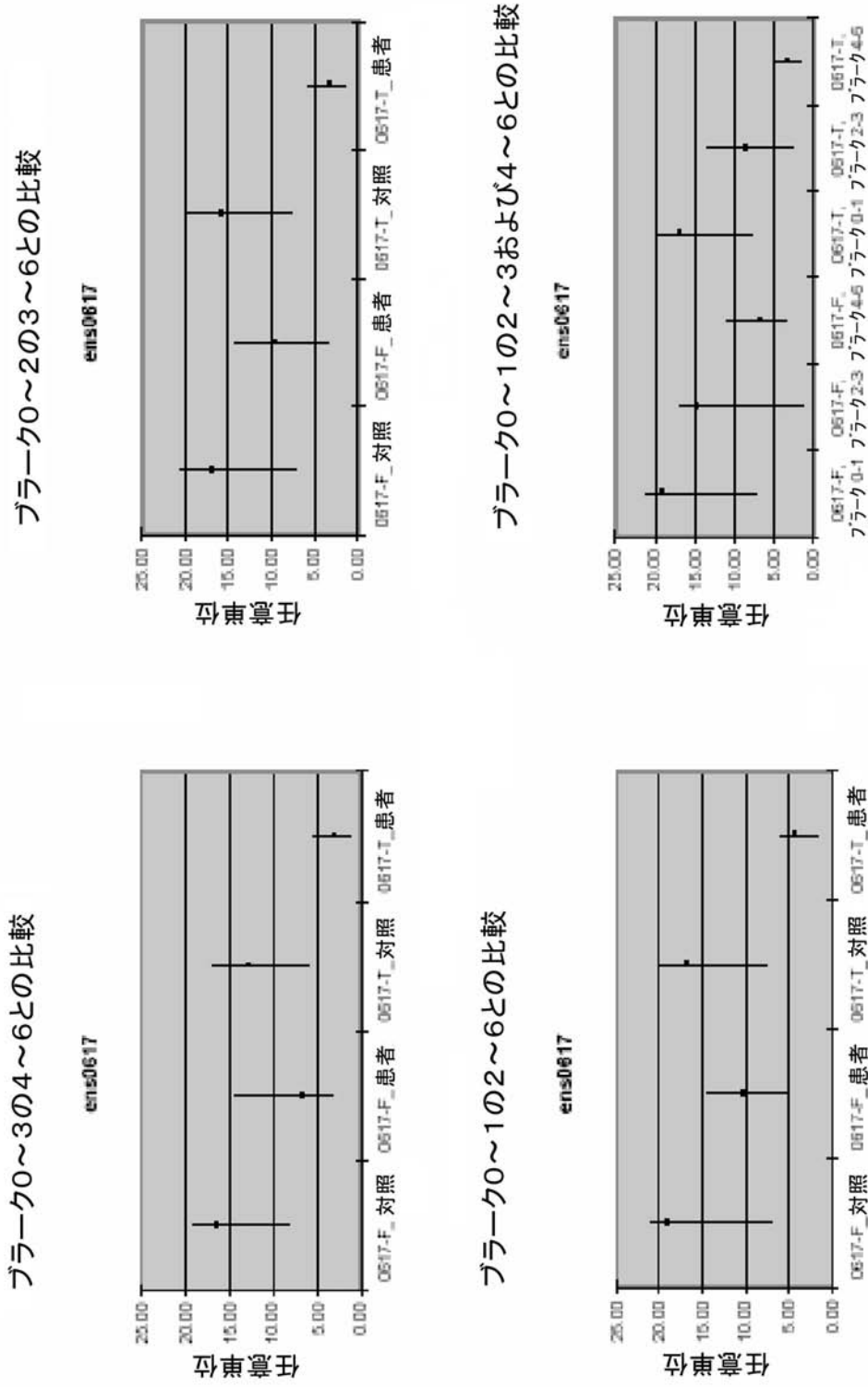


【 図 5 】
図5: SULT4A1スプライス変異体2の発現差の定量RT-PCR分析による検証



【 図 6 】

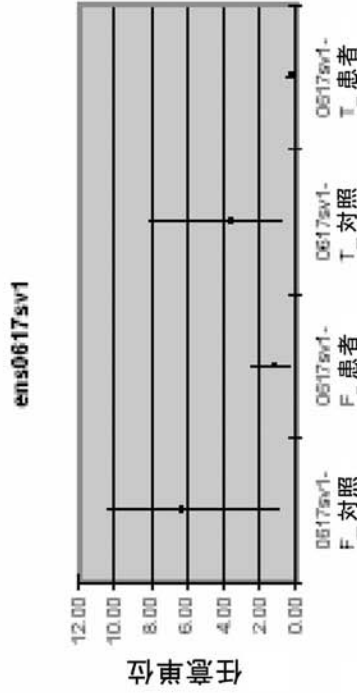
図6: SULT4A1 sv1および/またはSULT4A1 sv2の絶対mRNA発現の分析



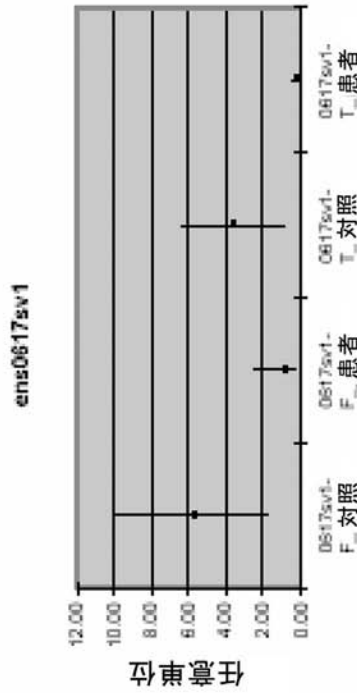
【 図 7 】

図7: SULT4A1sv1の絶対mRNA発現の分析

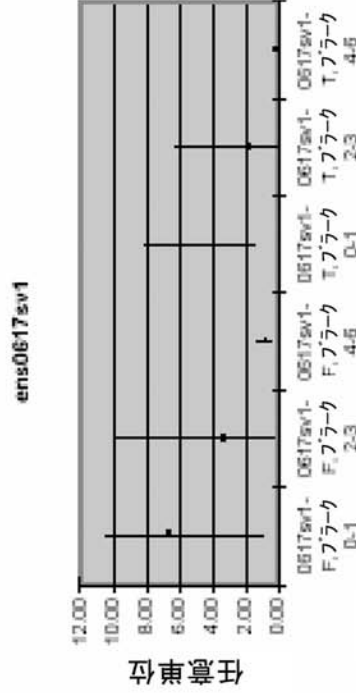
ブラーク0~2の3~6との比較



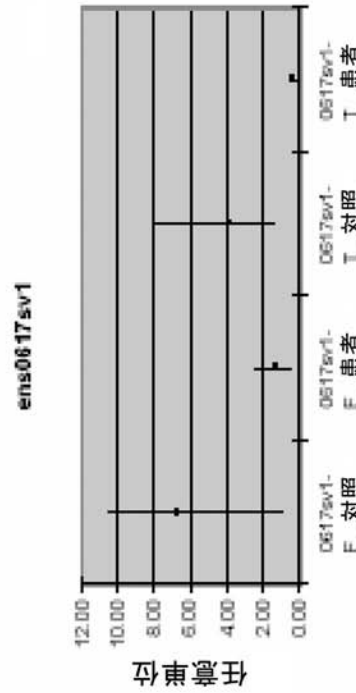
ブラーク0~3の4~6との比較



ブラーク0~1の2~3および4~6との比較

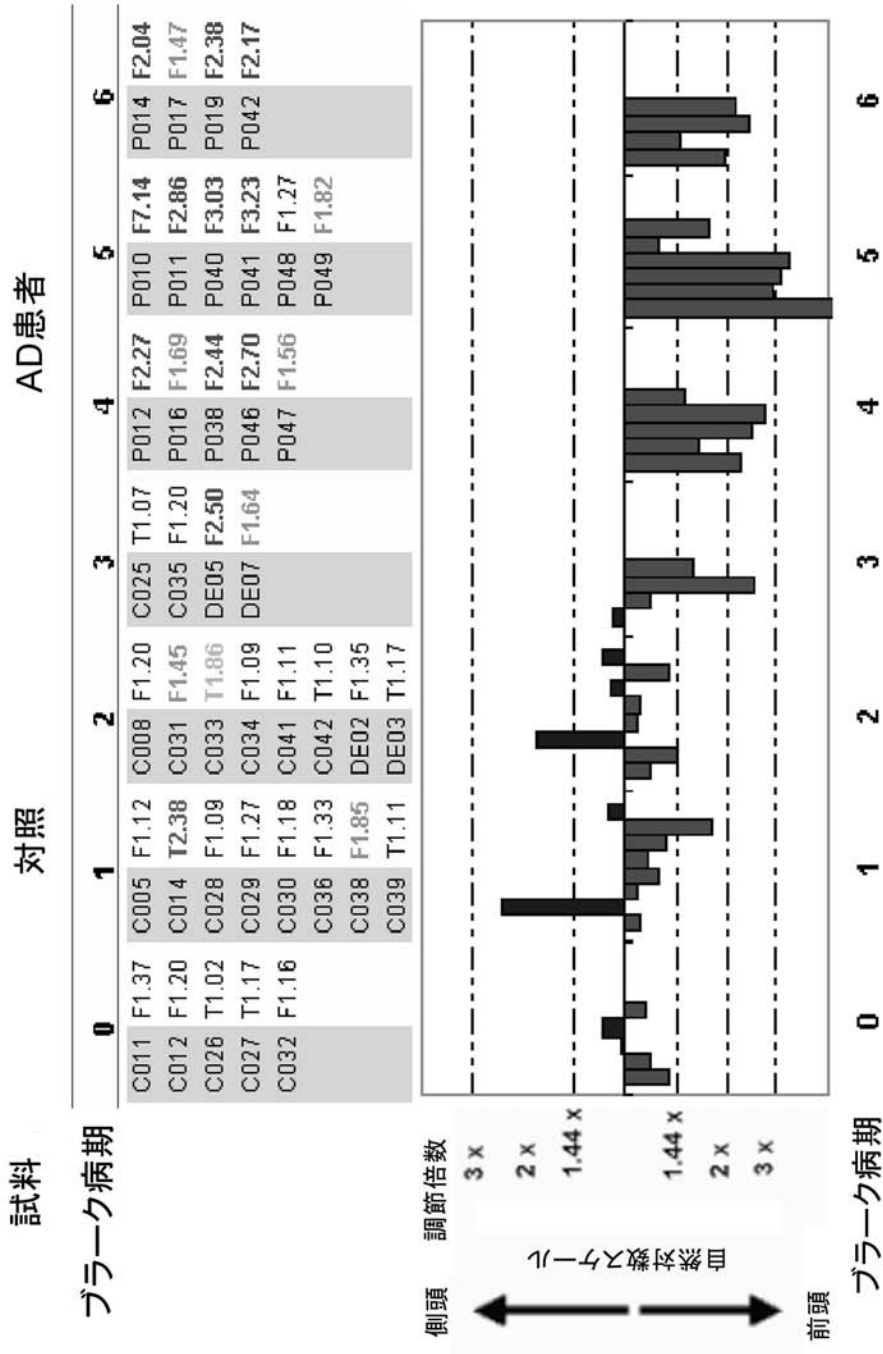


ブラーク0~1の2~6との比較



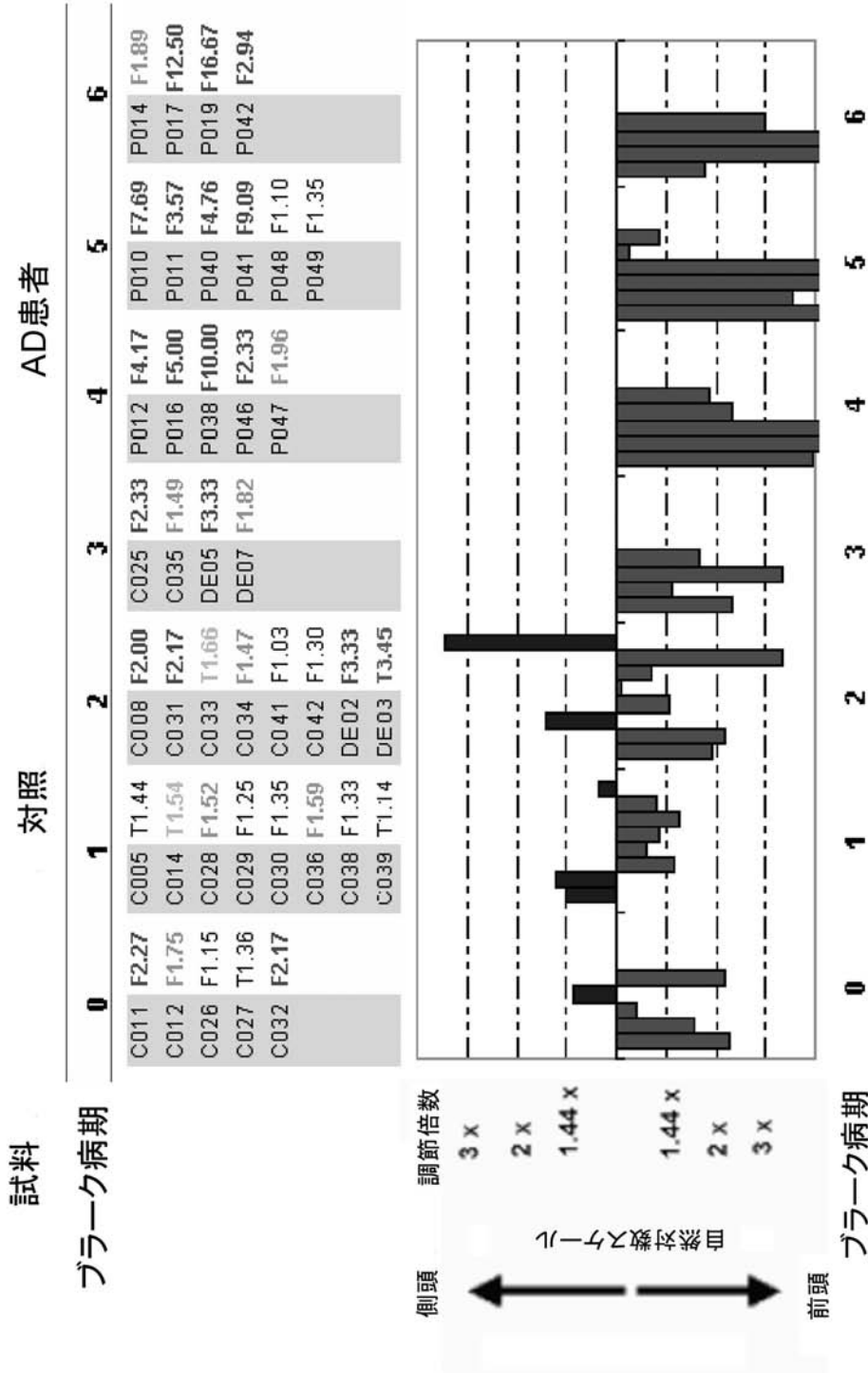
【 図 1 5 】

図15:



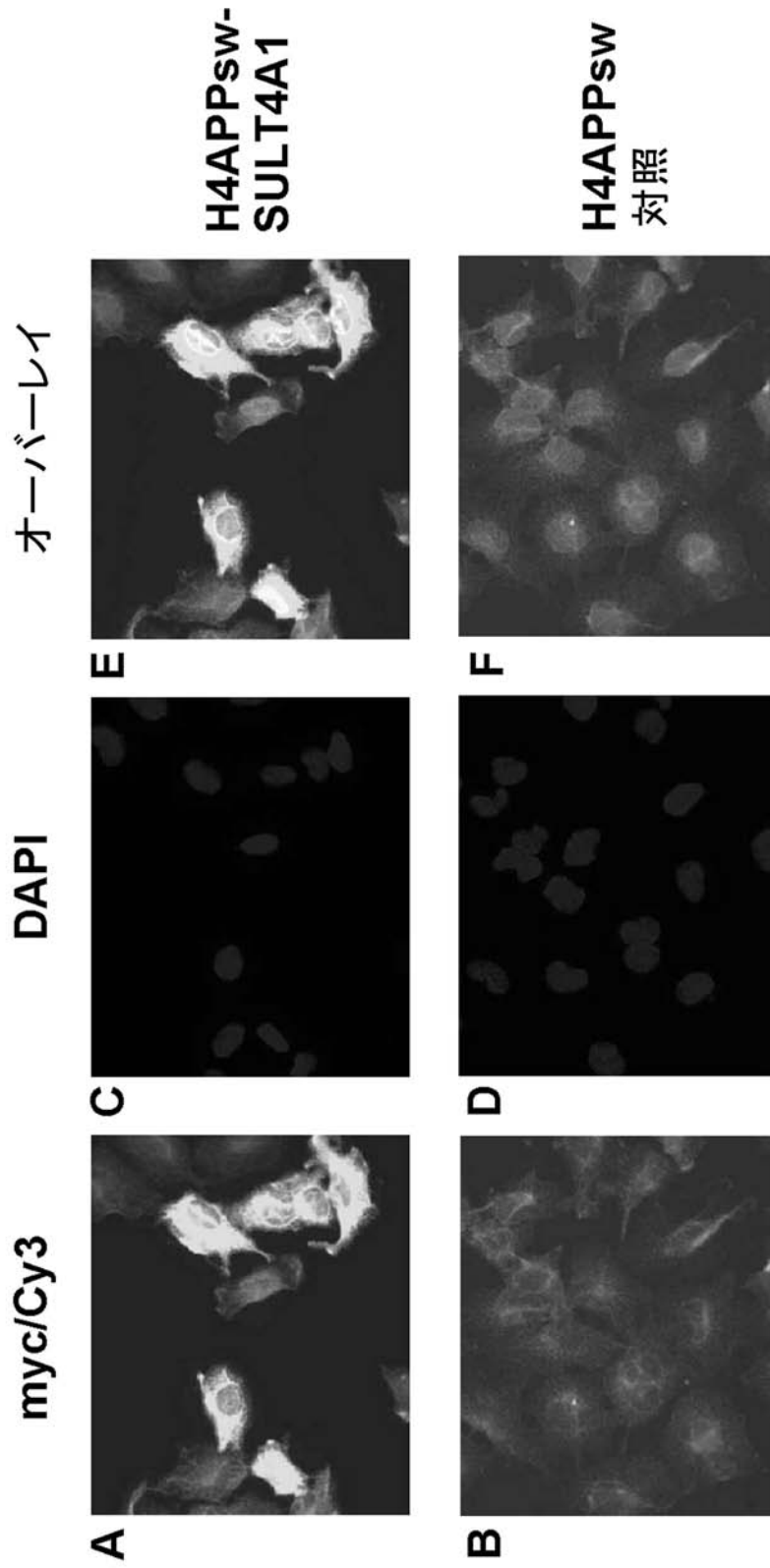
【 図 1 6 】

図16:



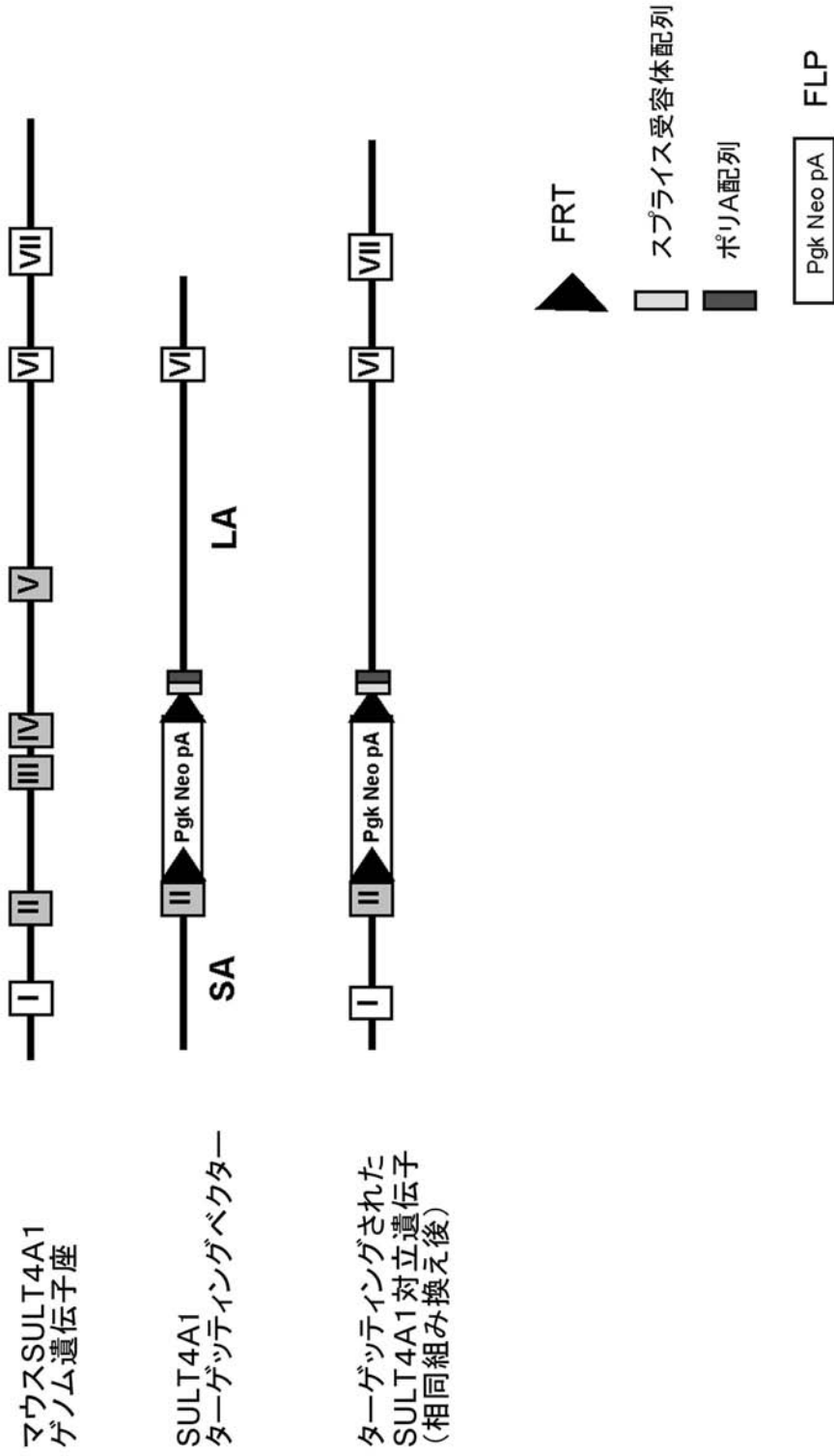
【 図 1 8 】

図18：神経膠種細胞におけるSULT4A1タンパク質の免疫蛍光分析



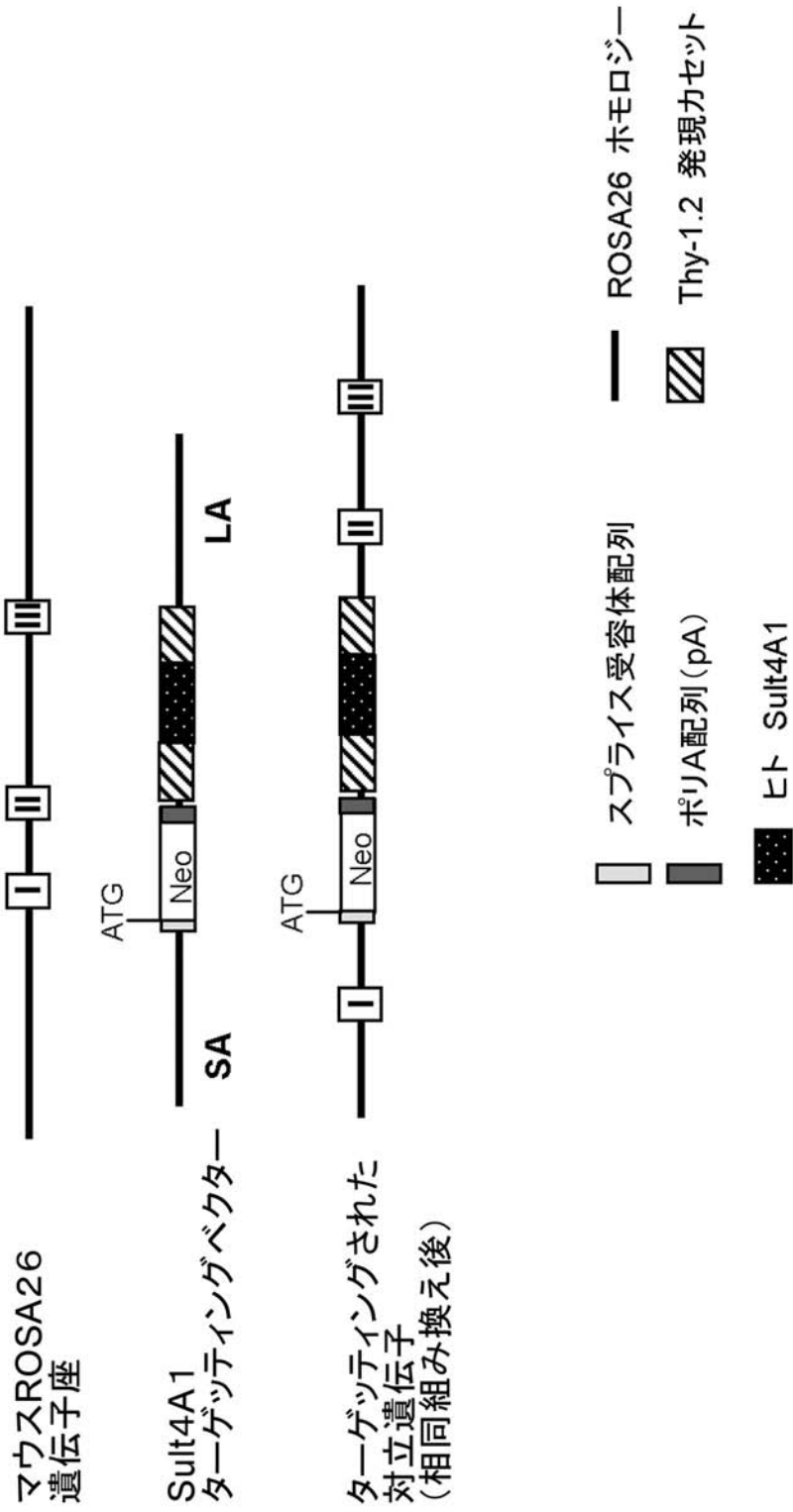
【 図 2 0 】

図20: Sult4A1 欠損マウスの作製



【 図 2 1 】

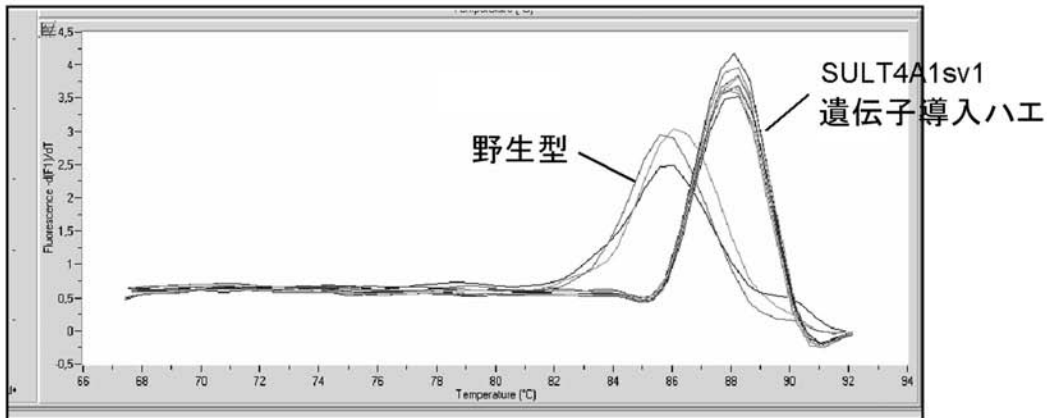
図21 : Sult4A1 遺伝子導入マウスの作製



【図 2 2】

図22: Sult4A1の導入遺伝子発現

A



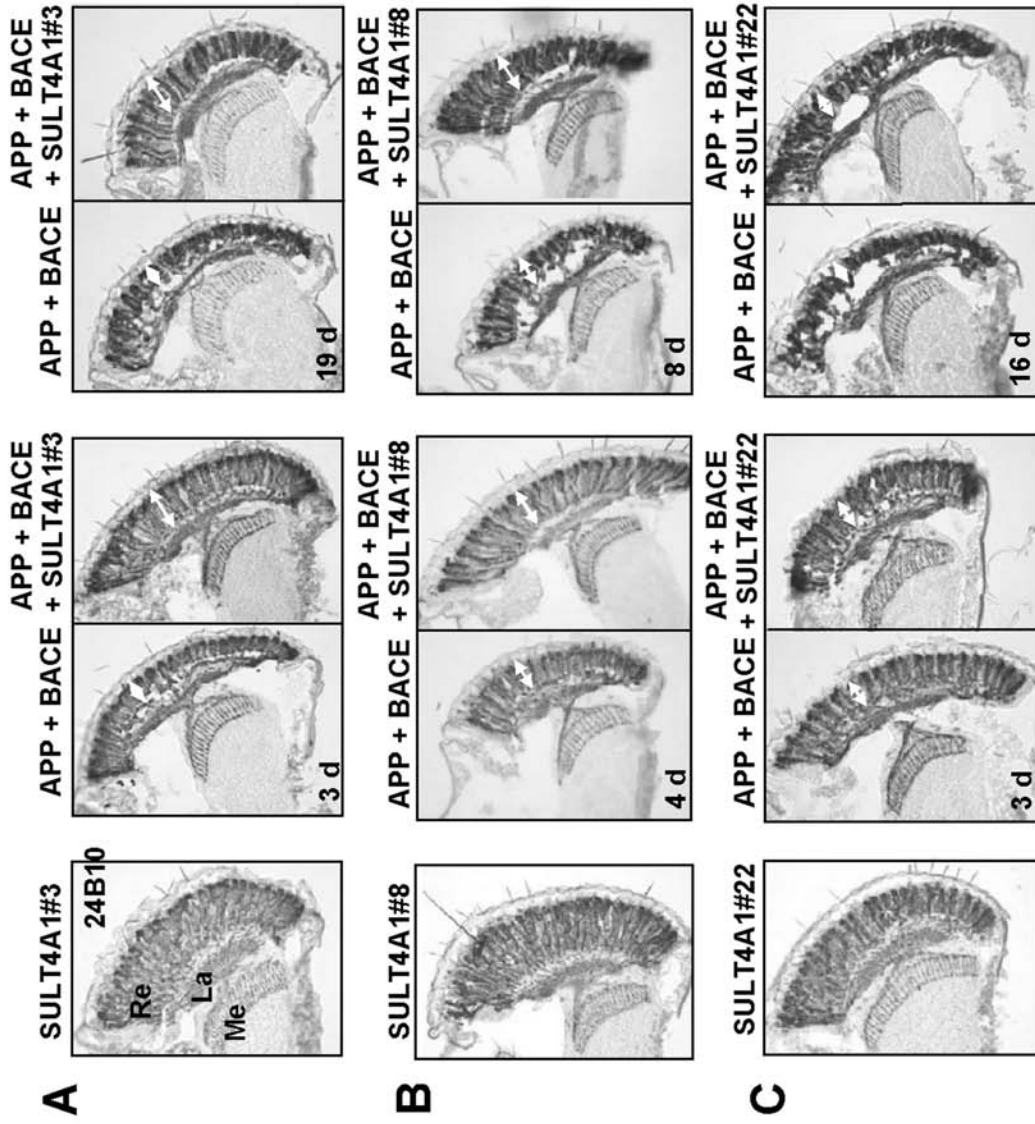
B

名称	サイクル数	平均	標準偏差	誤差 [%]	効率 (ハウスキーピング遺伝子に対する正規化表示)
SULT4A1#3	21.34	21.300	0.14422205	0.67709883	SULT4A1sv1#8より1.8倍大、 SULT4A1sv1#22より2.7倍大
SULT4A1#3	21.14				
SULT4A1#3	21.42				
SULT4A1#8	23.79	23.917	0.11676187	0.48820292	
SULT4A1#8	23.94				
SULT4A1#8	24.02				
SULT4A1#22		23.915	0.03535534	0.1478375	
SULT4A1#22	23.94				
SULT4A1#22	23.89				

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} \quad \text{勾配} = -2.960 \quad E = 2.176$$

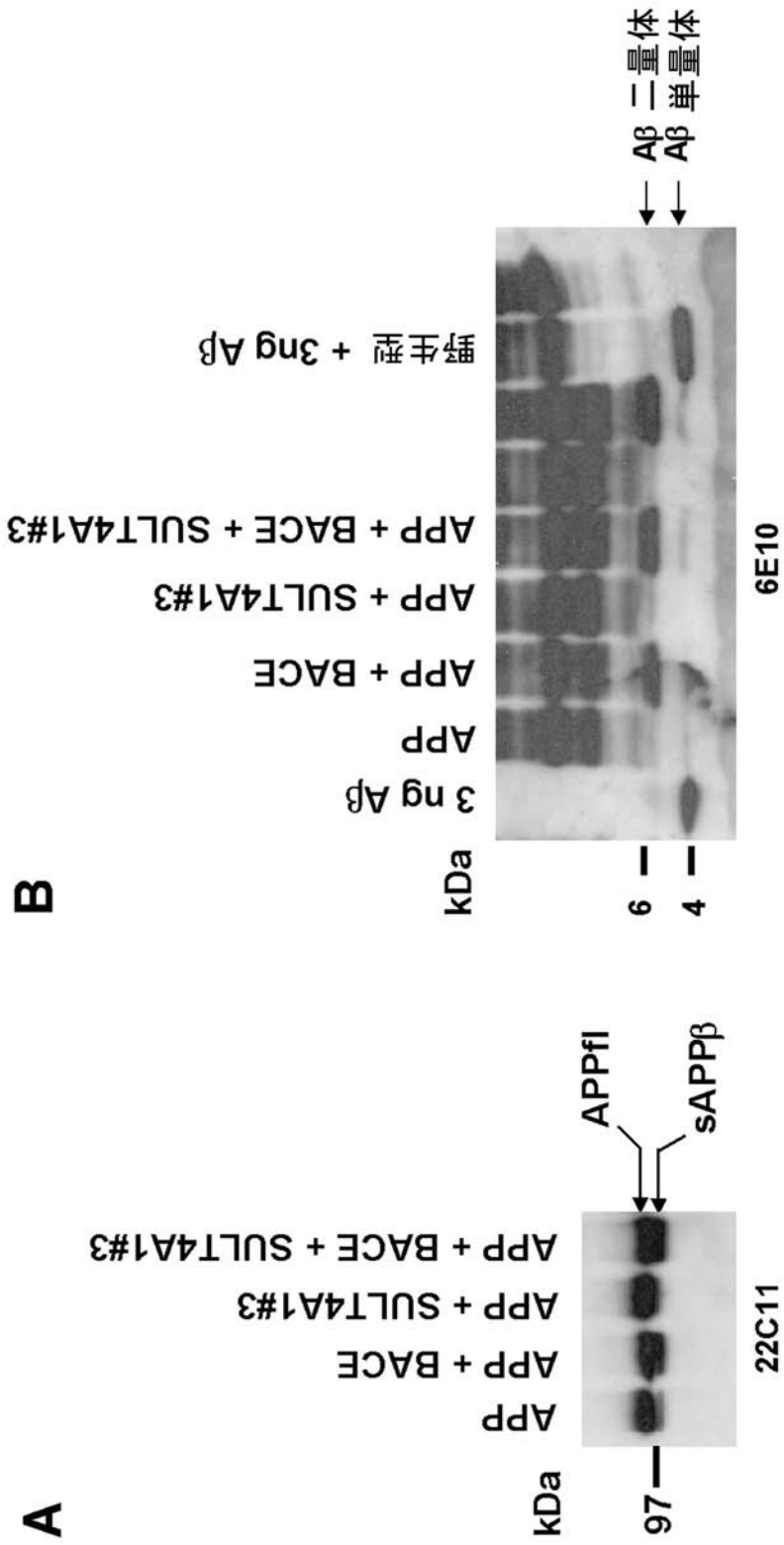
【 図 2 3 】

図23: Sult4A1発現の組織学的分析



【 図 2 4 】

図24: 遺伝子導入ハエにおける完全長およびプロセシングhAPPの発現

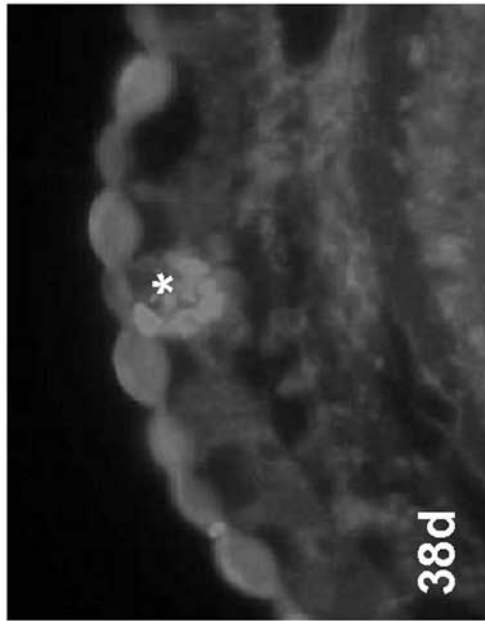


【 図 2 5 】

図25: 遺伝子導入ハエにおけるチオフラビンS陽性アミロイド斑

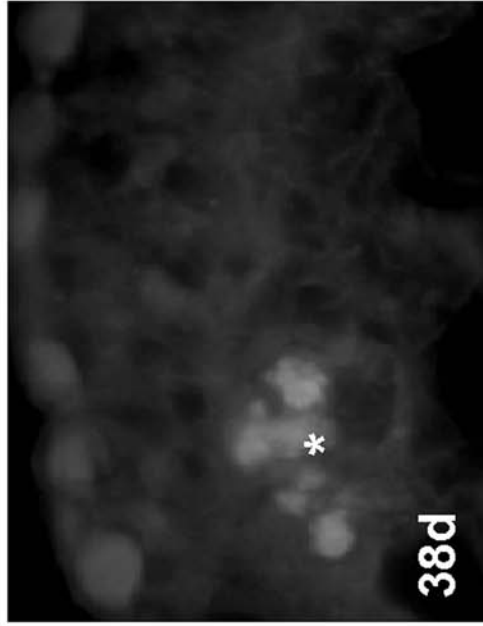
A

APP + BACE + PsnL235P



B

**APP + BACE + PsnL235P
+ SULT4A1#3**



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2004/052353

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C12Q1/48 A01K67/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/18541 A (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY; FARB, DAVID, H; MARTIN, STELLA) 7 March 2002 (2002-03-07) cited in the application	1-17
Y	the whole document	1-17
X	FALANY C N ET AL: "Molecular cloning and expression of novel sulphotransferase-like cDNAs from human and rat brain" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 346, no. 3, 15 March 2000 (2000-03-15), pages 857-864, XP002275713 ISSN: 0264-6021 cited in the application	1,3-17
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 March 2005		Date of mailing of the international search report 04/04/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Valcarcel, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/052353

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GLATT H ET AL: "Human cytosolic sulphotransferases: Genetics, characteristics, toxicological aspects" MUTATION RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 482, no. 1-2, 1 October 2001 (2001-10-01), pages 27-40, XP002275714 ISSN: 0027-5107 the whole document	1-17
A	HAN X ET AL: "Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease" MEDLINE, 1 August 2002 (2002-08-01), XP002965337 the whole document	1-17
P,Y	KIM S-B ET AL: "Neurosteroids: Cerebrospinal fluid levels for Alzheimer's disease and vascular dementia diagnostics" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, NEW YORK, NY, US, vol. 88, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 5199-5206, XP009028705 ISSN: 0021-972X the whole document	1-17
Y	WO 00/14251 A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC; TANG, Y., TOM; CORLEY, NEIL, C; GUEGLER,) 16 March 2000 (2000-03-16) In particular see SEQ ID NO: 7 the whole document	6-10
Y	JANUS C ET AL: "Transgenic mouse models of Alzheimer's disease" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, AMSTERDAM, NL, vol. 1502, no. 1, 26 July 2000 (2000-07-26), pages 63-75, XP004276974 ISSN: 0925-4439 the whole document	6-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/052353**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2004 /052353

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claim 5 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

Although claim 15 comprises a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/052353

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0218541	A	07-03-2002	AU 9501801 A WO 0218541 A2	13-03-2002 07-03-2002
WO 0014251	A	16-03-2000	AU 6142899 A CA 2343351 A1 EP 1109917 A2 JP 2004512804 T WO 0014251 A2	27-03-2000 16-03-2000 27-06-2001 30-04-2004 16-03-2000

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
		C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA12 DA13 DA14 DA36
 4B024 AA01 AA11 BA10 CA04 CA09 CA11 CA20 DA06 EA04 GA11
 HA01
 4B050 CC03 DD11 LL01 LL10
 4B063 QA01 QA18 QA19 QR06 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02
 4C084 AA13 AA17 NA14 ZA012 ZA022 ZA152 ZA162 ZA182 ZA202 ZA942

专利名称(译)	磺基转移酶在神经退行性疾病中的诊断和治疗用途		
公开(公告)号	JP2007508810A	公开(公告)日	2007-04-12
申请号	JP2006530259	申请日	2004-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	埃沃技术神经科学顺GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsungu		
申请(专利权)人(译)	埃沃技术神经科学顺GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	フォンデルカンマーハイツ ポールナーヨハーネス		
发明人	フォン デル カンマー ハイッツ ポールナー ヨハーネス		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/48 C12N9/10 A01K67/027 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/14 A61P21/04 A61P25/02 A61P25/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12N15/09 A01K67/033 C12N15/85 C12Q1/68 G01N33/68		
CPC分类号	A01K67/0275 A01K67/0333 A01K2217/05 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/0312 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 C07K2319/41 C12N9/13 C12N15/8509 C12Q1/48 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/6896 G01N2333/91194 G01N2500/00 G01N2500/02 G01N2800/28 G01N2800/2821		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA C12Q1/48.Z C12N9/10 A01K67/027 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/14 A61P21/04 A61P25/02 A61P25/00 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL10 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QR06 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA022 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA942		
优先权	60/506775 2003-09-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了阿尔茨海默氏病患者的特定脑区中胞质磺基转移酶表达的差异。基于该发现，本发明提供了一种用于确定受试者是否具有诊断或预测神经变性疾病，特别是阿尔茨海默病的高风险的方法，或者受试者是否有发展这种疾病的风险。此外，本发明提供了使用编码SULT4A1的基因治疗或预防阿尔茨海默病和相关神经变性疾病的治疗和预防方法。还公开了筛选神经变性疾病和重组动物模型的调节剂的方法。

