

(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2015-502332**(P2015-502332A)**(43) 公表日 **平成27年1月22日(2015.1.22)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/727 (2006.01)	A 6 1 K 31/727 Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 129 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-535120 (P2014-535120)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月15日 (2012.10.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年6月10日 (2014.6.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/070435
 (87) 国際公開番号 W02013/053954
 (87) 国際公開日 平成25年4月18日 (2013.4.18)
 (31) 優先権主張番号 61/547,226
 (32) 優先日 平成23年10月14日 (2011.10.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 12305414.0
 (32) 優先日 平成24年4月6日 (2012.4.6)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 502205846
 サントル ナショナル ドウ ラ ルシェ
 ルシュ シアンティフィク
 フランス国 パリ セデックス 16 リ
 ユ ミシエールアンジュ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患の診断、予後予測又は治療の方法

(57) 【要約】

本発明は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の診断、予後予測法又は治療法に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

a) 配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-0-スルホトランスフェラーゼ 2 及び 4 をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも 1 つ、及び/又は

b) 配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-0-スルホトランスフェラーゼ 2 及び 4 をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも 1 つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号 2 及び 4 で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも 1 つ、及び/又は

d) 前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は

e) ヘパラン硫酸、特に 3-0-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ 3-0-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、

f) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも 1 つの剤を含んでなり、前記剤が以下：

ヘパラン硫酸、又は

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響するとき、ヘパラン硫酸の活性及び/又はレベルとタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルとの両方が前記剤により影響されるか、

又は、前記遺伝子、前記遺伝子の前記転写産物、前記遺伝子の前記翻訳産物又は前記遺伝子若しくは前記転写産物若しくは前記翻訳産物の前記フラグメント若しくは誘導体若しくは変異型から選択される少なくとも 1 つの他の要素の活性及び/又はレベルもまた影響される、神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)の治療又は予防に使用するための組成物。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの剤が以下：

a) 約 2000 ダルトン ~ 約 20,000 ダルトン、好ましくは約 20,000 ダルトンの分子量を有する多糖又はオリゴ糖、特にヘパラン硫酸模擬体、例えば F6 分子、CR36、HM 100 若しくは HM 2602、又は特にペンタサッカリド、例えば Arixtra(登録商標)(フォンダパリヌクス)、フコイダン若しくはペントサンポリ硫酸、及び/又は低分子量ヘパリン、例えばエノキサパリン(Lovenox(登録商標))、及び/又は超低分子量ヘパリン、及び/又は

b) オリゴヌクレオチド、特に siRNA、例えば配列番号 71 で示されるセンス siRNA 及び配列番号 72 で示されるアンチセンス siRNA、配列番号 73 で示されるセンス siRNA 及び配列番号 74 で示されるアンチセンス siRNA、配列番号 75 で示されるセンス siRNA 及び配列番号 76 で示されるアンチセンス siRNA、配列番号 77 で示されるセンス siRNA 及び配列番号 78 で示されるアンチセンス siRNA からなるリストから選択される siRNA、又はモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド、特に配列番号 5 及び配列番号 6 からなる群より選択されるモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド、及び/又は

c) 小分子、ヘパリン及びヘパラン硫酸作用のインヒビター、例えばプロタミン又は硫酸プロタミン

からなる群より選択される、請求項 1 に記載の神経変性疾患の治療又は予防に使用する組成物。

【請求項 3】

以下：

a) 配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパラン硫酸グルコサミン 3-0-スルホトランスフェラーゼ 2 及び 4 をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺

10

20

30

40

50

伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び/又は

d) 前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は

e) ヘパリン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパリン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパリン硫酸二糖、及び/又は

f) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

のレベル及び/又は活性を、対象者から事前に得た生物学的流体サンプルにおいて測定し、前記レベル及び/又は前記活性を、既知の疾患又は健康状態を表すそれぞれの参照値と比較することを含んでなり、

但し、測定された活性及び/又はレベルが以下：

ヘパリン硫酸、又は

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

のものであるとき、ヘパリン硫酸の活性及び/又はレベルとタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルとの両方が測定されるか、又は前記遺伝子、前記遺伝子の前記転写産物、前記遺伝子の前記翻訳産物又は前記遺伝子若しくは前記転写産物若しくは前記翻訳産物の前記フラグメント若しくは誘導体若しくは変異型から選択される少なくとも1つの他の要素の活性及び/又はレベルもまた測定され、前記遺伝子及び/又は前記転写産物及び/又は前記翻訳産物及び/又は前記ヘパリン硫酸、特に前記3-O-硫酸化ヘパリン硫酸及び/又は前記タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の少なくとも1つのレベル及び/又は活性が対象者サンプル中で上昇していることが神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)を示すか又は前記神経変性疾患を発症するリスクを示す、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するためのインビトロ方法。

【請求項4】

前記神経変性疾患がタウオパチーである請求項3に記載のインビトロ方法。

【請求項5】

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質のレベルがそれぞれの参照値に比べて少なくとも10%上昇している、請求項4に記載のインビトロ方法。

【請求項6】

前記生物学的流体がCSFであり、対象者における以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される前記遺伝子、及び

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の前記転写産物、及び

c) 配列番号2及び4でそれぞれ示される前記遺伝子の前記翻訳産物、及び

d) 前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び

e) ヘパリン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパリン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパリン硫酸二糖の活性及び/又はレベルがそれぞれの参照値と実質的に同じであり、

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルが対象者においてそれぞれの参照値と比較して上昇しており、特に少なくとも10%上昇している

10

20

30

40

50

、請求項 4 又は 5 に記載のインビトロ方法。

【請求項 7】

前記神経変性疾患がアルツハイマー病である請求項 3 に記載のインビトロ方法。

【請求項 8】

配列番号 1 で示される遺伝子の転写産物のレベルがリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇している、請求項 7 に記載のインビトロ方法。

【請求項 9】

配列番号 3 で示される遺伝子の転写産物のレベルがリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇している、請求項 7 に記載のインビトロ方法。

【請求項 10】

リアルタイムPCRで測定するとき、配列番号 1 で示される遺伝子の転写産物のレベルが少なくとも100%上昇しており、配列番号 3 で示される遺伝子の転写産物のレベルが少なくとも100%上昇している、請求項 7 に記載のインビトロ方法。

10

【請求項 11】

配列番号 2 で示される前記遺伝子の前記翻訳産物のレベルがウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇している、請求項 7 に記載のインビトロ方法。

【請求項 12】

配列番号 4 で示される前記遺伝子の前記翻訳産物のレベルがウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇している、請求項 7 に記載のインビトロ方法。

20

【請求項 13】

配列番号 2 で示される前記遺伝子の前記翻訳産物のレベルがELISA又はウェスタンブロットで測定するとき少なくとも50%上昇しており、配列番号 4 で示される前記遺伝子の前記翻訳産物のレベルがウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇している、請求項 7 に記載のインビトロ方法。

【請求項 14】

ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性を測定することを更に含んでなり、前記レベル及び/又は活性が参照値と比較して少なくとも50%上昇していることがアルツハイマー病を示す、請求項 8 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のインビトロ方法。

30

【請求項 15】

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質のレベル及び/又は活性を測定することを更に含んでなり、それぞれの参照値と比較して少なくとも10%の上昇がアルツハイマー病を示す、請求項 8 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のインビトロ方法。

【請求項 16】

前記生物学的流体がCSFであり、以下：

a) 配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ 2 及び 4 をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも 1 つ、及び

b) 配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも 1 つ、及び

40

c) それぞれ配列番号 2 及び 4 で示される前記遺伝子の翻訳産物、及び

d) ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖の活性及び/又はレベル、及び

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルが対象者においてそれぞれの参照値と比較して上昇している、請求項 7 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のインビトロ方法。

【請求項 17】

以下：

50

配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-0-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも 1 つ、及び/又は

それぞれ配列番号 2 及び 4 で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも 1 つ、のレベル及び/又は活性を、対象者から得た生物学的流体サンプルにおいて検出し、前記サンプルで得られた前記レベル及び/又は活性を、既知の疾患又は健康状態を表すコントロールで得られたものと比較する手段からなる、対象者における神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は前記疾患を発症する対象者の性向若しくは素因を決定するためのキット。

10

【請求項 18】

タウタンパク質のリン酸化のレベルを前記対象者から得たサンプルにおいて測定し、前記サンプルで得られた前記レベルを、既知の疾患又は健康状態を表すコントロールで得られたものと比較し、異常リン酸化タウレベル及び/又は総タウレベル並びに配列番号 2 及び配列番号 4 の翻訳産物のレベルを既知の疾患又は健康状態を表すコントロールと比較する手段を更に含んでなる、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 19】

以下：

a) 神経変性疾患に罹患した動物、特に哺乳動物から事前に採集した生物学的流体サンプルを、試験化合物と接触させ、

20

b)

i. 配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-0-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも 1 つ、及び/又は

ii. 配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-0-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも 1 つ、及び/又は

iii. それぞれ配列番号 2 及び 4 で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも 1 つ、及び/又は

30

iv. 前記遺伝子又は転写若しくは翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は

v. ヘパラン硫酸、特に3-0-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-0-硫酸化ヘパラン硫酸二糖

vi. タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルを測定し、

c) 神経変性疾患を有する哺乳動物から事前に採集した、前記化合物に接触させていないコントロールの生物学的流体サンプル中の活性及び/又はレベルを測定し、

d) 接触させた生物学的流体サンプル中の前記活性及び/又はレベルの差と、非接触の生物学的流体サンプル中のものとを比較することを含んでなり、

40

接触させた細胞の前記活性及び/又はレベルの変化が、試験化合物が前記疾患のモジュレーターであることを示し、

但し、工程 b) で測定された活性及び/又はレベルが、以下：

ヘパラン硫酸、又は

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

のものであるとき、ヘパラン硫酸の活性及び/又はレベルとタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルとの両方が測定されるか、又は前記遺伝子、前記遺伝子の前記転写産物、前記遺伝子の前記翻訳産物又は前記遺伝子若しくは前記転写産物若しくは前記翻訳産物の前記フラグメント若しくは誘導体若しくは変異型から選択される少なくとも 1 つの他の要素の活性及び/又はレベルもまた測定される、神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患

50

はプリオン病とは異なる)のモジュレーターについてのインビトロスクリーニング方法。

【請求項 20】

前記哺乳動物がヒト又はマウス、例えばSAMP8マウス及び/又はADの3xTg-ADマウスモデルであるか、或いは前記動物がゼブラフィッシュである、請求項 19 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の診断、予後予測又は治療の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

神経変性疾患、特にアルツハイマー病(AD)は、患者の生活に対して活力を失わせる影響を有する。更に、これら疾患は、多大な健康上、社会的及び経済的重荷となる。ADは世界的に最も蔓延した神経変性疾患であり、世界中で27百万人以上が患っていると推定されている。ADは、臨床的に診断された全ての認知症の少なくとも50~70%を占め、65歳以上の人口の約10%、85歳以上では50%が罹患しているおそらく最も壊滅的な加齢性神経変性状態である。ADの発症年齢は、50年の範囲内で変化し得るが、早期発症型ADは65歳より若い人で生じ、遅発性ADは65歳より高齢の人に生じる。全症例の約10%が早期発症型ADを患い、僅か1~2%が家族性の変異体ベースの遺伝症例であり、残る98~99%は非変異が疾患に関係している散発性である。

臨床的には、ADは、記憶形成の早期欠損に関係し、究極的には高次認知機能の完全な低下に至る進行性疾患である。認知障害としては、とりわけ、記憶障害、失語症、健忘及び遂行機能の喪失が挙げられる。ADの病状の特性は、変性プロセスに対する特定脳領域及び神経細胞亜集団の選択的脆弱性である。具体的には、この疾患の進行の間、皮質側頭葉領域及び海馬が早期に、そしてより重篤に影響を受ける。他方、小脳のような他の脳領域のニューロンは、ほとんど無傷のままであり、神経変性から保護される(Annals of Neurology 1981, 10:184-192)。現在、ADの治療法は存在しないし、その進行を止める有効な治療も存在しない。ADの生前診断は、血液又は血漿サンプルでは依然として不可能であり、不幸にも他のタウオパチーからの鑑別AD診断を単独で達成できる、現在利用可能な脳脊髄液(CSF)中のバイオマーカーはない。

【0003】

病理学的には、ADは、それぞれA β ペプチド及び微小管関連タウタンパク質(MAPT)を蓄積する老人斑及び神経原線維もつれ(NFT)と呼ばれる2つの脳病変によって特徴付けられる。これら神経病理学的特徴は、神経変性プロセスの2つの対応する仮説「A β /アミロイドカスケード仮説」及び「タウ-リン酸化/NFT仮説」の原因をなす。「A β /アミロイドカスケード仮説」において、A β ペプチドは、 γ -セクレターゼ複合体(これはプレセニン-1又は2(PS-1又はPS-2)に会合する)によるアミロイド前駆体タンパク質(APP)の切断から生じ、典型的には42アミノ酸ペプチド(A β 42)の形成を導き、A β 42は細胞外で迅速に凝集して特徴的なアミロイド斑を形成する。APP、PS-1及びPS-2の遺伝子における遺伝子欠損に帰せられる早期発症型ADの稀な例が存在する。

ADの第2の特徴としてはタウタンパク質が挙げられる。これは、アルツハイマー病患者の脳内で、異常にリン酸化され凝集して対合螺旋状フィラメント(paired helical filament; PHF)及び神経原線維もつれ(NFT)を形成する(Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. Curr Alzheimer Res Dec;7(8):656-664)。脳内でのタウタンパク質異常リン酸化並びにNFT形成及び蓄積は、この疾患の病理学的、生化学的及び臨床的進行と直接相関付けられることが示されている。ADの予後、早期診断及び関連するタウオパチーからの鑑別診断についての大きい関心のために、ADに特徴的な予後予測用で且つ特異的なマーカーは発見が望まれている(CSF、血漿、唾液又は他の容易に取得可能な体液)。

【0004】

10

20

30

40

50

アルツハイマー(AD)又は他のタウオパチーを患う患者の脳におけるインビボNFT形成の第1の特徴の1つは、生理学的条件下ではリン酸化しない特定のアミノ酸残基でのタウの異常リン酸化である(Iqbal, Liuら; *Acta Neuropathol*;118(1):53-69; Gong and Iqbal, 2008; *Curr Med Chem* 15(23):2321-8)。タウ異常リン酸化の最初の結果は、微小管からの脱離である。これは、シナプス障害及び認知低下を生じ得る。タウが脱離すると、リン酸化は新たに接近可能となる微小管結合ドメインで継続し、得られる過剰リン酸化タウは凝集した後、オリゴマー化してNFTを形成する。このタウオリゴマー化及び続く細胞内のNFTへの凝集は、タウ過リン酸化の2番目の結果である。これは、その後、幾らかの細胞プロセスに影響して最終的には細胞を殺傷し、AD脳で概して検出されるゴーストNFT(ゴーストもつれ)を形成し得る。タウの異常リン酸化はまた、正常タウの凝集を誘導し、これは、僅かな割合ではあるが実際にNFT中に過リン酸化タンパク質と共に事実見出される(*Biochem Soc Trans* 38(4):962-6)。興味深いことに、リン酸化タウ凝集動力学、凝集体構造及び脳領域での凝集体の位置は、おそらく異なる脳領域でのタウの差異的変異効果又は未解明の他の因子の結果として、異なるタウオパチー間で異なる。重要なことには、非タウ変異がADに関わっている。

【0005】

リン酸化タウのNFTへの凝集がこの疾患の中核であると考えられているが、タウ変異が関わる動物モデルでの種々の研究により、NFT形成及び短縮化に対するタウのリン酸化の重要性が示唆されている(Garcia-Sierra, Mondragon-Rodriguezら 2008, *J Alzheimers Dis* 14:401-409)。例えば、トランスジェニックショウジョウバエ(*drosophila*)において、異常リン酸化タウの神経蓄積がNFT形成の不在下で神経変性を導いた(Wittmann, Wszolekら 2001; *Science* 293:711-714)。P301L-タウ変異が誘導されたトランスジェニックマウスモデルで、NFTが形成され続けるにもかかわらず異常に過リン酸化したタウが抑制されるとき、認知改善が観察された(Santacruz, Lewisら 2005; *Science* 309:476-481)。3xTgADマウスでは、可溶性A β 及び可溶性異常リン酸化タウの減少は認知低下を寛解したが、可溶性A β のみの減少は寛解しなかった(Oddo, Vasilevkoら 2006; *J Biol Chem* 281:39413-39423)。これらデータは、過リン酸化タウタンパク質が行動障害及びニューロン損失に関与していることを示唆する。重要なことには、ほとんどの動物モデルでは、異常なタウリン酸化はタウ遺伝子MAPTの変異に関連付けられている(Vandrovicova, Anayaら; *Curr Alzheimer Res* 7:726-734)が、これら変異はADには存在せず、よって過リン酸化はまたタウ変異非依存性因子に起因し得るとの仮定が可能になる。これは未だ明らかにされていない。

【0006】

AD患者では、タウ異常リン酸化を担う幾つかのキナーゼが、健常個体と同レベルで発現しており、この疾患では、これらタンパク質のいずれも非変異であることが報告されている。よって、過リン酸化は、リン酸化に関与するアミノ酸残基の提示を結果的に伴うタウタンパク質の立体構造変化により誘導され得ると想定されている。これら「病的」立体構造変化は、キナーゼ作用に不可欠であるようである(Hiraokaら, 2004, *Biochem Biophys Res Commun* 315:659-663; *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Mar 12;315(3):659-663)。タウを直接リン酸化し、したがって有用な治療標的と考えられる神経キナーゼとしては、ニューロンサイクリン依存性キナーゼ5(cdk5又はNCLK)、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3(GSK-3)及び微小管親和性調節キナーゼ(MARK)が挙げられる(Mazanetz and Fischer, 2007, *Nat Rev Drug Discov* 6:464-479; Hangerら, 2009, *Trends Mol Med* 15:112-119)。興味深いことに、非AD個体の脳では、これらキナーゼはタウを異常にリン酸化することができず、このことは、タウの立体構造変化が生じないか、存在しても非常に低レベルであり、病的レベルではないことを示唆する。疾患における重要性にもかかわらず、今日まで、キナーゼインヒビター、ホスファターゼアクチベーター及びNFT解離剤は、この疾患を停止又は後退させる真のプラス効果を提供しておらず、このことは、タウの異常リン酸化がこの病理について非復帰点であることを示唆している。よって、AD分野における優先事項の1つは、MAPT遺伝子変異非依存性のタウタンパク質異常リン酸化機序を解明す

10

20

30

40

50

ることである(Gong and Iqbal, 2008; Curr Med Chem 15:2321-2328)。

【0007】

タウが異常リン酸化部位が曝される立体構造を獲得することをヘパリンが可能にすることは、インビトロで、証明されている(Paudel and Li, 1999, J Biol Chem 274:8029-8038)。更に、NMR分光法実験は、ヘパリンがThr231残基を異常リン酸化を担うキナーゼに曝す立体構造変化を誘導することを証明している(Sibilleら, 2006, Biochemistry 45:12560-12572)。Thr231残基は、AD疾患進行の間に異常にリン酸化したタンパク質の最初の残基に含まれる。ヘパリン及び他のアニオン性巨大分子もまた、幾つかのタンパク質キナーゼによるタウのリン酸化を促進することが示されている(J Protein Chem. 1995 Feb;14(2):95-105. Song JS, Yang SD; Yang SD, Yu JS, Shiah SG, Huang JJ. J Neurochem. 1994 Oct;63(4):1416-25)。

10

【0008】

ヘパリン及びヘパラン硫酸(HS)は、グリコサミノグリカン(GAG)と呼ばれるポリアニオン性硫酸化グリカンのファミリーに属する。HS鎖は、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に連結したウロン酸から構成される反復二糖単位から形成される。生合成の間に、二糖鎖伸長が幾つかの改変の後に続く。改変としては、ウロン酸(GlcA)をイズロン酸(IdoA)に変換するC5-エピメラーゼによるエピマー化及び種々のスルホトランスフェラーゼ(それぞれ、IdoAの2-O-位で、GlcNの6-O-位で又はGlcNの3-O-位でスルフェート基を導入するNDST(N-デアセチル-0-スルホトランスフェラーゼ)、HS2ST(2-OST)、HS6ST(6-OST)及びHS3ST(3-OST)を含む)が保証する種々の部位選択的硫酸化(Sandwallら, 2010; Glycobiology;20(5):533-41)が挙げられる。種々のスルホトランスフェラーゼの上手に統制された発現は、細胞が上手に制御するHS配列の多様性をもたらす。HSは、ヘパリン結合性タンパク質(HBP)として知られるタンパク質ファミリー(幾つかの増殖因子、マトリクスタンパク質、サイトカインなどを含む)の機能の調節因子としての重要な生物学的役割を演じていると認識されている。HSの構造及び調節活性は、基本的には、N-2-O及び6-O位でのHS鎖の特異的硫酸化により発揮される。3-O-位のみが、抗凝固及びウイルス感染に直接関連付けられている。興味深いことに、これらHS構造は、組織内で高度に一定であるが、各組織機能に適切に適合するように組織ごとに変わる。しかし、HS構造及び機能は、加齢に伴い(Huynh MBら, Neurobiol Aging. 2011 Oct 27)、病状に伴い又は組織損傷後(Huynh MBら, J Biol Chem. 2012)に相当変化することが示されている。他の硫酸化位置と比較して、非常に低い3-O-硫酸化レベルは、抗凝固のような標的付けられた生物活性を発揮するに十分であり得る。3-O-硫酸化は、いずれの認識されている増殖因子やサイトカインの活性調節にも必要でなく、細胞外マトリクスにおけるHSのいずれの機械的機能にも重要でなく、よって、任意の栄養活性にもHSにも必要でない。

20

30

【0009】

HSスルホトランスフェラーゼの中で、NDST、2-OST及び6-OSTが最も一般的に発現し、それら活性は、増殖因子の活性を調節するHS硫酸化構造体の産生を生じる。3-OST(HS3ST)は、HS鎖中の総スルフェートの約0.5%を占める。脊椎動物の3-OSTファミリーにおける多数の遺伝子は、或る細胞タイプが特異的微小構造体HSを生成することで病理学的事象をモジュレートし得るという具合に、機能的異質性を示唆する。このことは、異なる硫酸化二糖を産生する特異イソフォームの発現に依存し得る。3-OST-1は、アンチトロンビン(AT)-結合ドメインに必須であるトリ硫酸化GlcA-GlcNS3S±6S単位を産生する。3-OST-2は、トリ硫酸化GlcA2S/IdoA2S-GlcNS3S(トリS単位)及びテトラ硫酸化GlcA2S/IdoA2S-GlcNS3S6S単位(テトラS単位)を形成する。3-OST-3A及び-3Bは、同一の触媒ドメインを有し、トリ硫酸化IdoA2S-GlcNH23S±6S単位を形成する。3-OST-5は、トリ硫酸化HexA-GlcNS3S6S、トリS単位及び/又はテトラS単位を産生する。

40

ADのバイオマーカー探索は、近年、顕著に進展してきた。体液(例えば、脳脊髄液(CSF)、血漿及び尿)は、ADバイオマーカー開発に重要な供給源と考えられる。しかし、今日まで、CSFのみが、脳細胞外空間との直接的接触に起因して、脳内で起こる生化学的变化を反映し得る。今までは、3つのCSFバイオマーカーA 42、総タウ(t-タウ)及びリン酸化-

50

タウ(p-タウ)が、高い診断能力を有すると判明している(de Souza LC ら ; J Neurol Neurosurg Psychiatry;82(3):240-6)。タウは、通常、細胞内タンパク質であると考えられているにもかかわらず、疾患の場合、過リン酸化タウは、細胞外及び脳脊髄液(CSF)中に見出される。炎症及び酸化ストレスのバイオマーカーも他の供給源として挙げられる。不運にも、現在利用可能なバイオマーカーはいずれも、単独でこの疾患の診断を達成できず、2以上のバイオマーカーを同時にモニターすることが、疾患進行を検出するに適切であると示唆されている(Anoopら , International Journal of Alzheimer's Disease 2010)。

【 0 0 1 0 】

SH-SY5Y細胞は、主として研究に使用されるヒト神経芽腫の細胞株である。SH-SY5Yをレチノール酸で分化させることで、ADのインビトロモデルとして適切な、長い神経突起を有する神経様表現型を示す細胞が利用可能になる(Datki Zら ; Neurobiol Dis 2004;17(3):507-15)。タウの異常リン酸化は、これら細胞において、2つの異なるアプローチで誘導することができる：(i)(タウをコードする遺伝子MAPTのP301L変異で特徴付けられる最も一般的なタウオパチーの1つである)前頭側頭型認知症に特徴的なP301L変異を含有するヒトタウタンパク質(FTDP-17)を安定的にトランスフェクトした細胞を用いるタウ変異依存性アプローチ(Huttonら , 1998, Nature 393:702-705) ; 及び(ii)H₂O₂ストレス負荷細胞(この細胞も酸化ストレスの結果としてタウ過リン酸化を生じる)に基づく変異非依存性アプローチ(Reynolds CHら ; J Neurochem. 2000 Apr;74(4):1587-95)。H₂O₂誘導リン酸化は、おそらく、(ミトジェン活性化タンパク質(MAP)キナーゼファミリーのメンバーであり、種々の形態のストレスにより開始されるシグナル伝達カスケードに参与する)ストレス活性化キナーゼ(例えば、c-Jun N-末端キナーゼ(JNK)及びp38)により誘導されると報告されている。これらキナーゼの標的としては、微小管関連タウタンパク質が挙げられる(Reynolds CH J Neurochem. 2000 Apr;74(4):1587-95)。

【 0 0 1 1 】

AD及び関連する疾患の病理機序の解明を補助するため、特徴的なタウ異常リン酸化及びNFT形成を伴うタウオパチーのようなヒト組織病理学的特徴を再現する遺伝子改変マウス、ハエ、サカナ及びワームが開発されている。最近、Paquetらは、生存している動物において細胞及び細胞下レベルでの疾患進行の画像化を可能にする半透明の胚を有すると共に遺伝子を取り扱い易い、タウオパチーのゼブラフィッシュモデルを紹介した。ゼブラフィッシュモデルシステムのこれら特徴により、このモデルは薬剤スクリーニング及び他のタイプの応用研究に有用となる(Paquetら , 2009, J Clin Invest 119:1382-1395)。

Paquetのタウオパチーモデルは、第17染色体に関連したパーキンソン症候群を伴うFTD(脳における高レベルの異常リン酸化タウの産生によって特徴付けられるタウオパチーである)の患者に見出される、タウをコードする遺伝子MAPTにおけるタウ-P301L変異を再現する(FTDP-17)。Paquetは、新たに設計したGal4-上流活性化配列ベース(Gal4/UASベース)のベクター系(これはまた、同時に発現する蛍光レポーターによるトランスジェニックサカナの同定を大いに容易にする)により、ゼブラフィッシュニューロンにおけるヒトタンパク質のトランスジェニック発現を最適化した。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 2 】

ほとんどのタウ指向性薬剤発見プログラムは、初期研究段階にあり、A に着目したプログラムより相当に遅れている。しかし、最近、重要な臨床試験において、アルツハイマー病患者の脳内のA 量を低減させることを目的とした剤が不成功に終わったことで、他の治療アプローチ(病的タウレベルを低減させるものを含む)を希求する必要性が強調される。

【 0 0 1 3 】

本発明の1つの目的は、神経変性疾患の治療又は予防に使用する組成物を提供することである。

本発明の別の1つの目的は、組織、CSF又は血液中の3-O-スルホトランスフェラーゼ 2

10

20

30

40

50

若しくは4の遺伝子若しくはタンパク質又はグリカン産物により、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を診断又は予後予測する方法を提供することである。

本発明の別の1つの目的は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を診断又は予後予測する前記方法を実施するためのキットを提供することである。

本発明の別の1つの目的は、3-OST-2及び/又は-4遺伝子の発現レベルを減少させるか、又は前記遺伝子若しくはその産物の活性を阻害する化合物により、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を治療又は予防する方法を提供することである。

本発明の更に別の1つの目的は、ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖のレベルを減少させる化合物により、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を治療又は予防する方法を提供することである。

本発明の更に別の1つの目的は、グルコサミン残基の3位で硫酸化したヘパラン硫酸のレベルを減少させる化合物により、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を治療又は予防する方法を提供することである。

【0014】

本発明の更に別の1つの目的は、タウタンパク質のリン酸化レベルを減少させる化合物により、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を治療又は予防する方法を提供することである。

本発明の更に別の1つの目的は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病のモジュレーターのインビトロスクリーニング方法を提供することである。

本発明の更に別の1つの目的は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病のモジュレーターのインビボスクリーニング方法を提供することである。

本発明の更に別の1つの目的は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の治療又は予防に使用し得る組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び/又は

d) 前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は

e) ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び/又は

f) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルに、参照値と比較して、直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を含んでなる、神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)の治療又は予防に使用するための組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】

【発明を実施するための形態】

【0017】

表現「活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤」により、前記遺伝子及び/又は前記転写産物及び/又は前記翻訳産物の活性及び/又はヘパラン硫酸

10

20

30

40

50

、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸及び/又はタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルに影響し得る独特な剤が理解される。

上記標的の少なくとも1つ、すなわち前記遺伝子及び/又は前記転写産物及び/又は前記翻訳産物及び/又はヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖及び/又はタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルに影響し得る2以上の異なる剤もまた理解されるべきである。

【0018】

本説明の全てにおいて：

用語ヘパリン硫酸又はヘパラン硫酸又はHSを使用することができ、これらは同義である

。

3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖は、ヘパラン硫酸のヘパリナーゼI~III消化後に得られる。

用語ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ(2又は4)又はヘパラン硫酸(グルコサミン) 3-O-スルホトランスフェラーゼ(2又は4)は同義である。両酵素は、3-O-ST-2及び3-O-ST-4又は3OST2及び3OST4、HS3ST2及びHS3ST4、h3-O-ST-2及びh3-O-ST-4；ヘパラン硫酸3-O-スルホトランスフェラーゼ2；ヘパラン硫酸3-O-スルホトランスフェラーゼ4；ヘパラン硫酸D-グルコサミニル 3-O-スルホトランスフェラーゼ2；ヘパラン硫酸D-グルコサミニル 3-O-スルホトランスフェラーゼ4；ヘパラン硫酸グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2；ヘパラン硫酸グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ4とも呼ばれる。

【0019】

本明細書及び特許請求の範囲で使用する単数形態「a」、「an」及び「the」は、文脈がそうでないことを示していない限り、複数のもも含む。例えば、「a cell(細胞)」は複数の細胞も意味するという具合である。用語「及び/又は」は、本明細書及び特許請求の範囲で使用する場合、この語の前後の句が二者択一として選択されるもの又は組合せのいずれとしても見なされるべきことを意味する。例えば、「レベル及び/又は活性の測定」との記載は、レベルのみ若しくは活性のみ又はレベル及び活性の両方が測定されることを意味する。用語「レベル」は、本明細書中で使用する場合、転写産物、例えばmRNA、又は翻訳産物、例えばタンパク質若しくはポリペプチド、又は酵素活性の産物、例えば特異的硫酸化を有するグリカン構造体の量、量の程度又は濃度を含む意味である。用語「活性」は、本明細書中で使用する場合、生物学的効果を生じる転写産物若しくは翻訳産物又は酵素の能力の程度、或いは生物学的に活性な分子のレベルの程度、或いはグリカンから得られる特異的に硫酸化された配列又は二糖のレベルの程度として理解される。用語「活性」はまた、酵素活性或いは(結合、拮抗、抑制、ブロッキング又は中和をいう)生物活性及び/又は薬理活性もいう。用語「レベル」及び/又は「活性」は、本明細書中で使用する場合、更に、産生する産物の量で測定される遺伝子発現レベル若しくは遺伝子活性又は酵素活性レベルをいう。

【0020】

遺伝子発現は、本明細書中で使用する場合、更に、遺伝子発現レベル又は遺伝子活性をいう。遺伝子発現は、遺伝子産物、タンパク質、ペプチド又はグリカンの産生を導く転写及び翻訳による、遺伝子に含まれる情報の利用として定義することができる。酵素活性は、本明細書中で使用する場合、更に、酵素産物の程度をいう。「調節不全」は、遺伝子発現のアプレギュレーション又はダウンレギュレーションを含む。遺伝子産物は、RNA又はタンパク質を含み、遺伝子の発現の結果である。グリカン分子における遺伝子産物は、タンパク質活性により導入される特定のグリコシド置換、例えば硫酸化のレベルを含む。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ために使用することができる。酵素産物の量は、酵素がどの程度活性であるかを測定するために使用することができる。用語「遺伝子」は、本明細書及び特許請求の範囲で使用する場合、コーディング領域(エキソン)及び非コーディング領域(例えば非コーディング調節エレメント、例えばプロモーター又はエンハンサー、イントロン、リーダー及びトレイラー配列)の両方を含む。遺

10

20

30

40

50

伝子産物は、RNA又はタンパク質を含み、遺伝子発現の結果である。酵素活性は、酵素がどのように存在しているかを測定するために使用することができる。用語「ORF」は、「オープンリーディングフレーム」の頭文字であり、少なくとも1つのリーディングフレーム中に停止コドンを有さず、したがって場合によりアミノ酸配列に翻訳され得る核酸配列をいう。「調節エレメント」は、遺伝子発現を駆動、調節する誘導性及び非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター及び他のエレメントを含む。

【0021】

用語「フラグメント」は、本明細書中で使用する場合、例えばオルターナティブスプライシングされた、又は短縮された、又はその他切断された転写産物又は翻訳産物を含むという意味である。グリカン分子について、用語フラグメントは、本明細書中で使用する場合、グリカンを消化してオリゴ糖又はより短いフラグメントを生じる(二糖まで進行)内因性又は外因性酵素の作用によりインビボ又はインビトロで産生される任意のサイズのグリカンを含むという意味である。用語「誘導體」は、本明細書中で使用する場合、変異体、又はRNA編集(RNA-edited)、又は酵素消化産物又は化学的に改変されたか若しくはその他変更された翻訳産物をいう。明確性を目的として、例えば、誘導體転写物とは、核酸配列に変更(例えば、単一又は複数のヌクレオチドの欠失、挿入又は交換)を有する転写物をいう。「誘導體」は、変更されたリン酸化若しくはグリコシル化若しくはアセチル化若しくは脂質化又は変更されたシグナルペプチド切断若しくは他のタイプの成熟切断のようなプロセスで生成され得る。これらプロセスは翻訳後に起こり得る。

10

【0022】

用語「モジュレーター」とは、本発明及び特許請求の範囲で使用する場合、遺伝子又は遺伝子転写産物又は遺伝子翻訳産物又は酵素産物のレベル及び/又は活性を変化又は変更させることができる分子をいう。好ましくは、「モジュレーター」は、遺伝子の転写産物又は翻訳産物の生物活性を変化又は変更させることができる分子である。モジュレーションは、例えば、生物活性及び/又は薬理活性及び/又は酵素活性の増加又は減少、結合特性の変化、又は遺伝子翻訳産物の生物学的機能性若しくは免疫学的性質における任意の他の変化又は変更であり得る。「モジュレーター」とは、酵素及び/又はイオンチャネルサブユニット又はイオンチャネルの機能的性質を増強又は阻害し、したがって「モジュレート」し、イオンチャネルサブユニットの結合、拮抗、抑制、ブロック、中和又は隔離を「モジュレート」し、及び活性化、拮抗及びアップレギュレーションを「モジュレート」する能力を有する分子をいう。「モジュレーション」はまた、細胞の生物活性に影響する能力をいうためにも使用される。用語「モジュレーター」、「剤」、「試薬」又は「化合物」とは、細胞、組織、体液に対して又は任意の生物学的系若しくは試験する任意のアクセシ系に関して、正又は負の生物学的効果を有する任意の物質、化学物質、組成物又は抽出物をいう。これらは、標的のアゴニスト、アンタゴニスト、部分アゴニスト又はインバーサアゴニストであり得る。これらは、核酸、天然若しくは合成のペプチド又はタンパク質複合体又は融合タンパク質、天然若しくは合成のグリカン又はグリカン模擬体、例えばヘパラン硫酸模擬体であり得る。これらはまた、抗体、有機若しくは無機の分子、又は組成物、小分子、薬剤及び前記剤のいずれかの任意の組合せであり得る。これらは、検査、診断又は治療目的に使用され得る。このようなモジュレーター、剤、試薬又は化合物は、細胞培養培地に存在する因子であり得る。

20

30

40

【0023】

用語「オリゴヌクレオチドプライマー」又は「プライマー」とは、相補塩基対のハイブリダイゼーションにより標的ポリヌクレオチドを得られるようにアニールし得、ポリメラーゼにより伸長され得る短い核酸配列をいう。これらは、特定配列に特異的であるように選択されてもよく、ランダムに選択されてもよい(例えば、これらは混合物中の可能な全ての配列をプライムする)。本明細書中で使用するプライマーの長さは、10ヌクレオチドから300ヌクレオチドまで変化し得る。「プローブ」は、本明細書中で説明、開示された核酸配列又はこれと相補的な配列の短い核酸配列である。これらは、所与の配列の完全長配列又はフラグメント、誘導體、イソフォーム若しくは変異型を含み得る。「プローブ」と

50

アッセイサンプルとの間のハイブリダイゼーション複合体を同定することで、当該サンプル内における他の類似配列の存在を検出することが可能になる。本明細書中で使用する場合、「ホモログ又は相同性」は、或るヌクレオチド又はペプチド配列と別のヌクレオチド又はペプチド配列との関連性を述べるために当該分野で使用される用語であり、これは、比較する配列同士間の同一性及び/又は類似性の程度によって決定される。当該分野において、用語「同一性」及び「類似性」は、ポリペプチド又はポリヌクレオチド配列の関連性の程度を意味し、これは、クエリー配列と他の配列、好ましくは同じタイプの配列(核酸又はタンパク質配列)とを互いにマッチングさせることにより決定される。「同一性」及び「類似性」を計算して決定するに好適なコンピュータプログラム法としては、GCC BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)、BLASTN 2.0(Gixh W., <http://blast.wustl.edu>)、FASTA及びGCG GclMerge(これは、最も長いオーバーラップを有する一対のコンテイングを決定して整列させる)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0024】

用語「変異型」は、本明細書中で使用する場合、本発明で開示したポリペプチド及びタンパク質に言及するときは、本発明の天然型ポリペプチド又はタンパク質の天然型アミノ酸配列内で1以上のアミノ酸が付加及び/又はされている任意のポリペプチド又はタンパク質をいう。更に、用語「変異型」は、任意のより短い又はより長いバージョンのポリペプチド又はタンパク質を含む。「変異型」はまた、HS3ST2及びHS3ST4のアミノ酸配列(配列番号2及び配列番号4の配列)と少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。タンパク質分子の「変異型」としては、例えば、高度保存領域に保存的アミノ酸置換を有するタンパク質が挙げられる。本発明の「タンパク質及びポリペプチド」としては、HS3ST2及び/又はHS3ST4のアミノ酸配列(配列番号2及び配列番号4の配列)を含んでなるタンパク質の変異型、フラグメント及び化学物質誘導体が挙げられる。代替塩基配列に起因して或るコドンが別のコドンで置換されているが、該DNA配列より翻訳されたアミノ酸配列は不変のままである配列バリエーションも含まれる。当該分野において公知のこの現象は、特定のアミノ酸に翻訳されるコドンセットの縮重と呼ばれる。機能性に対して効果を有さないアミノ酸の交換(例えば、リジンについてアルギニン、ロイシンについてバリン、グルタミンについてアスパラギン)もまた含まれる。天然から単離し又は組換え及び/若しくは合成手段により製造することができるタンパク質及びポリペプチドも含まれ得る。天然型タンパク質又はポリペプチドとは、天然に存在する短縮型又は分泌型、天然に存在する形態(例えばスプライス-変異型及び天然に存在する対立遺伝子変異型)をいう。

【0025】

用語「単離(された)」は、本明細書中で使用する場合、変更されたか及び/又は天然環境から取り出され(すなわち、通常存在する組織、細胞又は生物から単離され)、天然では関連していることが見出されている共存成分から分離若しくは実質的に精製されている分子又は物質をいうとみなされる。これらは「非天然型」とも呼ばれる。この概念は、更に、この分子をコードする配列が天然状態では連結されていることがあり得ること及びこの分子が組換え及び/又は合成手段により産生され得る(非天然型)ことを意味する。前記目的のために、配列が当業者に公知の方法により生物又は非生物組織体中に導入され得る場合で、そのような配列が前記生物又は非生物組織体中に依然として存在する場合であっても、それらは依然として単離されており、非天然型であるとみなされる。本発明において、用語「リスク」、「感受性」及び「素因」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使用される。

【0026】

用語「AD」はアルツハイマー病を意味する。「AD型神経障害」は、本明細書中で使用する場合、本発明に記載され、技術水準文献(Ballard Cら, Lancet 2011; 377(9770):1019-1031)で一般に知られているように、神経病理学的、神経生理学的、組織病理学的及び臨床的特徴をいう。用語「Braakステージ」又は「Braakステージ決定」とは、Braak及びBraak(Braak H, Neurosci Lett. 1986; 65:351-355)により提唱された基準に従う脳の分類を

いう。神経原線維もつれ及びニューロパイル系の分布に基づいて、ADの神経病理学的進行は6つのステージに分割される(ステージ0~6)。本発明において、Braakステージ0~2は健常コントロール個体(「コントロール」)を表し、Braakステージ4~6はADに罹患した個体(「AD患者」)を表す。前記「コントロール」から得られた値は「既知の健康状態」を表す「参照値」であり、前記「AD患者」から得られた値は「既知の疾患状態」を表す「参照値」である。Braakステージ2は、健常コントロール個体又はAD患者を表し得る。Braakステージが高くなるほど、ADの症状を示す確率が高くなる。神経病理学的評価のために、すなわち、ADの病理学的変化が認知症の基礎原因である確率の推定のために、Braak Hによる推奨が提供されている(www.alzforum.org)。

【0027】

10

本発明による神経変性疾患又は障害は、AD、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、前頭側頭型認知症、進行型核上性麻痺、皮質基底核変性症、脳血管性タウオパチー及び軽度認知障害を含む。神経変性プロセスに關与する病状は、例えば、加齢性黄斑変性、ナルコレプシー、運動ニューロン疾患及び外傷性神経傷害及び修復並びに多発性硬化症である。

プリオン病は、本発明の範囲には含まれない。

表現「ヘパラン硫酸」とは、タウタンパク質に結合し得るヘパラン硫酸及びタウタンパク質に結合しないヘパラン硫酸を含む総ヘパラン硫酸をいう。

特に、タウタンパク質に結合し得るヘパラン硫酸は、本質的に、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸からなる。

20

総タウタンパク質は、リン酸化タウタンパク質(凝集しているもの又はしていないもの)及び非リン酸化タウタンパク質を意味する。

【0028】

本発明者らは、1つ又は2つの酵素(3-OST-2及び/又は3-OST-4)及び/又は3-O-硫酸化ヘパラン硫酸及び/又はタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルのモジュレーションが神経変性疾患を治療又は予防し得ることを見出した。

【0029】

本発明は、以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

30

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び/又は

d) 前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は

e) ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び/又は

40

f) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルに、参照値と比較して、直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を含んでなり、前記剤が以下：

ヘパラン硫酸、又は

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響するとき、ヘパラン硫酸の活性及び/又はレベルとタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルとの両方が前記剤により影響されるか、

又は、前記遺伝子、前記遺伝子の前記転写産物、前記遺伝子の前記翻訳産物又は前記遺伝

50

子若しくは前記転写産物若しくは前記翻訳産物の前記フラグメント若しくは誘導体若しくは変異型から選択される少なくとも1つの他の要素の活性及び/又はレベルもまた影響される、神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)の治療又は予防に使用するための組成物に関する。

【0030】

よって、この実施形態において、下記のリストに挙げられる幾つの場合があり得る。すなわち、前記剤は、下記：

- a)、b)、c)又はd)から選択される1つの要素のみ(したがって、e)のみ又はf)のみの活性及び/又はレベルは排除されることを意味する)；

- 以下の組合せから選択される2つの要素：a-b、a-c、a-d、a-e、a-f、b-c、b-d、b-e、b-f、c-d、c-e、c-f、d-e、d-f又はe-f；

- 以下から選択される3つの要素：a-b-c、a-b-d、a-b-e、a-b-f、a-c-d、a-c-e、a-c-f、a-d-e、a-d-f、a-e-f、b-c-d、b-c-e、b-c-f、b-d-e、b-d-f、b-e-f、c-d-e、c-d-f又はd-e-f；

- 以下から選択される4つの要素：a-b-c-d、a-b-c-e、a-b-c-f、a-c-d-e、a-c-d-f、a-d-e-f、b-c-d-e、b-c-d-f、c-d-e-f；

- 以下から選択される5つの要素：a-b-c-d-e、a-b-c-d-f、a-b-d-e-f、a-c-d-e-f；

- 以下から選択される6つの要素：a-b-c-d-e-f

の活性及び/又はレベルに影響する。

【0031】

1つの有利な実施形態において、本発明は、以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び

d) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を含んでなり、神経変性疾患がアルツハイマー病である、神経変性疾患の治療又は予防に使用する上記組成物に関する。

【0032】

本発明者らは、1つ又は2つの酵素(3-OST-2及び/又は3-OST-4)及び/又は3-O-硫酸化ヘパラン硫酸及び/又はタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルのモジュレーションがアルツハイマー病を治療又は予防し得ることを更に見出した。

【0033】

1つの有利な実施形態において、本発明は、以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び

d) ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び

e) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を含んでなり、神経変性疾患がアルツハイマー病である、神経変性疾患の治療又は予防に使用する上記組成物に関する。

【0034】

1つの有利な実施形態において、本発明は、以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び

d) ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を含んでなり、神経変性疾患がアルツハイマー病である、神経変性疾患の治療又は予防に使用する上記組成物に関する。

【0035】

1つの有利な実施形態において、本発明は、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する1つの剤を含んでなり、神経変性疾患がタウオパチーである、神経変性疾患の治療又は予防に使用する上記組成物に関する。

タウオパチーでは、タウタンパク質の異常リン酸化は、タウタンパク質遺伝子における変異又は欠失の結果であり、3-Ost-2及び-4遺伝子の発現は変化しない。

【0036】

本発明者らは、タウタンパク質の異常リン酸化のレベルをモジュレートするか又は該レベルに影響する剤による、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルのモジュレーションがアルツハイマー病を含むタウオパチーを治療又は予防し得ることを更に見出した。

1つの有利な実施形態において、本発明は、以下：

a) ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び、

b) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を含んでなり、神経変性疾患がタウオパチー、特にアルツハイマー病である、神経変性疾患の治療又は予防に使用する上記組成物に関する。

1つの有利な実施形態において、その活性及び/又はレベルが(タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルにも影響する)前記少なくとも1つの剤により影響される前記ヘパラン硫酸とは、タウタンパク質に結合し得るヘパラン硫酸をいう。

【0037】

本発明者らは、タウタンパク質へのヘパラン硫酸の結合と競合し得る剤が、ヘパラン硫酸並びにタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルをモジュレートするか又は該活性及び/又はレベルに影響し得、したがって細胞外へのリン酸化タウタンパク質の遊離、よって別の細胞へのリン酸化タウの拡散を防止することにより、タウオパチー、特にアルツハイマー病を治療し得ることを更に見出した。

【0038】

1つの有利な実施形態において、本発明は、以下：

a) それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び

b) ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び

c) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を含んでなり、神経変性疾患がタウオパチー、特にアルツハイマー病である、神経変性疾患の治療又は予防に使用する上記組成物に関する。

【0039】

1つの有利な実施形態において、本発明は、以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び

b) ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び

c) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を含んでなり、神経変性疾患がタウオパチー、特にアルツハイマー病である、神経変性疾患の治療又は予防に使用する上記組成物に関する。

【0040】

1つの有利な実施形態において、本発明は、以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び

d) ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を含んでなり、神経変性疾患がアルツハイマー病である、神経変性疾患の治療又は予防に使用する上記組成物に関する。

【0041】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記少なくとも1つの剤が、以下：

a) 約2000ダルトン～約20,000ダルトン、好ましくは約20,000ダルトンの分子量を有する多糖又はオリゴ糖、特にヘパラン硫酸模擬体、例えばF6分子、D6、D4、E5、CR36、HM 100若しくはHM 2602、又はフコイダン若しくはペントサンポリ硫酸、又は特にペンタサッカリド、例えばArixtra(登録商標)(フォンダパリヌクス)、フコイダン若しくはペントサンポリ硫酸、及び/又は低分子量ヘパリン、例えばエノキサパリン(Lovenox(登録商標))、及び/又は超低分子量ヘパリン、及び/又は

b) オリゴヌクレオチド、特にsiRNA、例えば配列番号71で示されるセンスsiRNA及び配列番号72で示されるアンチセンスsiRNA、配列番号73で示されるセンスsiRNA及び配列番号74で示されるアンチセンスsiRNA、配列番号75で示されるセンスsiRNA及び配列番号76で示されるアンチセンスsiRNA、配列番号77で示されるセンスsiRNA及び配列番号78で示されるアンチセンスsiRNAからなるリストより選択されるsiRNA、又はモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド、特に配列番号5及び配列番号6からなる群より選択されるモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド、及び/又は

c) 小分子、ヘパリン及びヘパラン硫酸作用のインヒビター、例えばプロタミン又は硫酸プロタミン

からなる群より選択される、神経変性疾患の治療又は予防に使用する上記組成物に関する。

【0042】

前記少なくとも1つの剤は多糖又はオリゴ糖であり得、これら用語は、経口、静脈内、舌下及び/又は経鼻投与により遺伝子産物のオリゴ糖又は多糖競合体の適用をいう。一般

10

20

30

40

50

に、グリカン療法は、HSアナログ、例えば種々のサイズ及び置換を有するデキストラン誘導体、例えばW000/05270に引用されているもの、又はカルボキシレート及び/又はスルフェート及び/又は疎水性部分が導入されている種々のサイズのコイダン誘導体、更にペントサンポリ硫酸及び他の天然のグリコサミノグリカン、例えばヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸(-A、-B、-C、-D、-E)、ケラタン硫酸(Masato Hasegawaら, J Biol. Chem. Vol. 272, No. 52, pp. 33118-33124, 1997)の使用をベースにする。このようなグリカンは、標的遺伝子の産物の分子置換体として及び/又は内因性タンパク質活性のモジュレーターとして及び/又は標的遺伝子の産物の競合体として作用する。

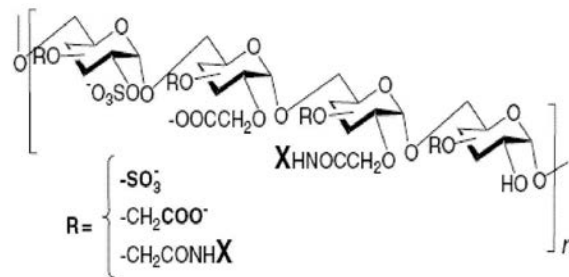
このようなグリカンは、単独で又は好ましくは他の療法、例えば遺伝子療法と組み合わせ投与することができる。標的遺伝子の内因性多糖又はオリゴ糖産物を模倣し及び/又はこれと競合し及び/又はこれと置き換わることができる生物学的に活性な硫酸化多糖又はオリゴ糖誘導体の製造は報告されている(W000/05270)。この製造方法としては、種々のサイズのデキストラン、セルロース又は他のグリカン若しくはポリアルコールにカルボキシレート及び/又はスルフェート及び/又は疎水性部分を導入することが挙げられる(W000/05270)。

多糖又はオリゴ糖はまた、低分子量のヘパリン、例えばエノキサパリン(Lovenox(登録商標))、又は超低分子量ヘパリンであり得る。

【0043】

用語ヘパラン硫酸模擬体(HM)とは、下記一般式(I)のグリコサミノグリカン(GAG)模倣分子のフラグメントをいう：

【化1】



(I)

(式中：

n は 1 ~ 10,000、特に 1 ~ 200 の間の整数を表し、

R は、 SO_3^- 、 CH_2CO_2^- 又は $-\text{CH}_2\text{CONHX}$ (ここで、NHX は、直鎖又は分岐鎖の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルキルアミン、特に n-オクチルアミン又は t-オクチルアミン、ベンジルアミン、カルボン酸部分でアルキル又はベンジルでエステル化されているか又はされていないアミノ酸(L、D 又はラセミ)、特に L-フェニルアラニンメチルエステル(L-Phe(OMe)) 又は L-チロシンメチルエステル又は L-ヒスチジンメチルエステル又はそれらの対応する D-アナログを表す)を表す)。

HM は、Papy-Garcia ら (Papy-Garcia D ら, *Macromolecules*, 2005, 38, 4647-4654) に記載されているように、種々の分子量を有するデキストラン分子、特にデキストラン T40、T10 又は T5 (それぞれ、MW = 40000、10000 又は 5000) から製造することができる。

【0044】

具体的には、ヘパラン硫酸模擬体とは、

n が 1 ~ 50、特に 1 ~ 40、特に 1 ~ 30、特に 1 ~ 20、特に 1 ~ 10 の間の整数を表し、

R が、上記のとおりであり、ここで、NHX はベンジルアミン又はアミノ酸、例えば L-Phe(OMe) であり、

置換度が以下：0.2 ~ 1.5CM、0 ~ 0.5 (ベンジルアミン又は AA)、0.2 ~ 1.5S (ここで、CM はカルボキシメチル基に相当し(20 ~ 150% 含量が可能)、S はスルフェート基に相当し(20 ~ 150% 含量が可能)；ベンジルアミン又は AA (アミノ酸) に相当する(0 ~ 50% 置換が可能)) である上記式 (I) をいう。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

具体的には、HMは、以下のものに対応する：

- F6分子(T5から製造、NHX = L-Phe(OMe))、これは以下の置換度を有する：
0.61CM、0.15L-Phe(OMe)、0.7 S
- D4分子(T10から製造)、これは以下の置換度を有する：
0.75CM、0.2 S；

ここで、CMはカルボキシメチル基に相当し(75%；20～150%含量が可能)、Sはスルフェート基に相当し(20%；20～150%含量が可能)；L-Phe(OMe)は0%で存在する(0～50%置換が可能)

- E5分子(T10から製造)、これは以下の置換度を有する：
0.5CM、1.0 S

ここで、CMはカルボキシメチル基に相当し(50%；20～150%含量が可能)、Sはスルフェート基に相当し(100%；20～150%含量が可能)；L-Phe(OMe)は0%で存在する(0～50%置換が可能)

- D6分子(T0.5から製造、NHX = L-Phe(OMe))、これは以下の置換度を有する：
0.60CM、0.2L-Phe(OMe)、1.2 S

ここで、CMはカルボキシメチル基に相当し(60%；20～150%含量が可能)、Sはスルフェート基に相当し(120%；20～150%含量が可能)；L-Phe(OMe)は20%で存在する(0～50%置換が可能)

ここで、CMはカルボキシメチル基に相当し(61%；20～150%含量が可能)、Sはスルフェート基に相当し(70%；20～150%含量が可能)；L-Phe(OMe)は15%で存在する(0～50%置換が可能)

【 0 0 4 6 】

- CR 36分子(T10から製造、NHX = L-Phe(OMe))、これは以下の置換度を有する：
0.59CM、0.22L-Phe(OMe)、0.83 S

ここで、CMはカルボキシメチル基に相当し(59%；20～150%含量が可能)、Sはスルフェート基に相当し(83%；20～150%含量が可能)；L-Phe(OMe)は22%で存在する(0～50%置換が可能)

- HM100(フコイダン) 0.50CM、0.20Ac、1 S (Ac = アセテート基)

ここで、CMはカルボキシメチル基に相当し(50%；20～150%含量が可能)、Sはスルフェート基に相当し(100%；20～150%含量が可能)；アセテート基は10%で存在する(0～50%置換が可能)

- HM 2602(T40から製造、NHX = ベンジルアミン)、これは以下の置換度を有する
0.88CM、0.20ベンジルアミン、0.66 S

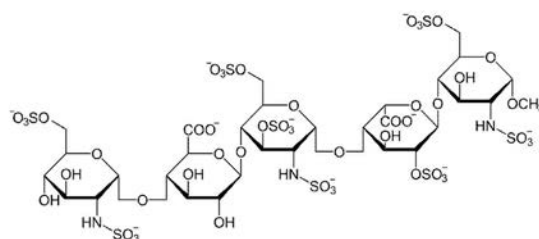
ここで、CMはカルボキシメチル基に相当し(88%；20～150%含量が可能)、Sはスルフェート基に相当し(66%；20～150%含量が可能)；ベンジルアミド基は20%で存在する(0～50%置換が可能)。

【 0 0 4 7 】

用語ペンタサッカリドとは、5つのグリコシド単位から構成され、硫酸化されている合成ヘパリン模擬体、例えばアンチトロンビンに結合し得るヘパリンの部分という。

具体的には、前記ペンタサッカリドは、以下の式のArixtra(登録商標)(フォンダパリヌクス)である：

【 化 2 】



10

20

30

40

50

【0048】

前記多糖、オリゴ糖又はペンタサッカリドは、ヘパリン硫酸又は3-O-硫酸化ヘパリン硫酸と競合し得、内因性脳GAGより良好な親和性でタウタンパク質に結合して、タウタンパク質の異常リン酸化を低減させ得る。

よって、前記多糖、オリゴ糖又はペンタサッカリドは、タウオパチー及びアルツハイマー病を治療し得る。

前記多糖、オリゴ糖又はペンタサッカリドは、約1.5mg/Kg～約50mg/Kgの間の用量で静脈内経路により、又は別の経路、例えば経口経路により約50mg/kg～約500mg/kg、特に100～200mg/kgの用量で、又はi.vで該経路に適切な投薬量で投与することができる。

1つの有利な実施形態において、前記多糖、オリゴ糖又はペンタサッカリドは、約100mg～約3.5gの間の日用量で静脈内経路により、又は別の経路、例えば経口経路により約3.5g～約50g、特に7.5～15gの日用量で、又はi.pなどで該経路に適切な投薬量で投与することができる。

【0049】

前記少なくとも1つの剤はまた、オリゴヌクレオチドであり得、この用語は、配列番号1及び3で示される遺伝子の発現に干渉し得るsiRNA(例えば上記のもの)、少なくとも1つのmiRNA、上記siRNAの1つのセンス配列及び1つのアンチセンスを含んでなる少なくとも1つのshRNA、モルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド又はそれらの組合せを指称し、これは、3-OST-2又は-4遺伝子をサイレンシングして前記遺伝子発現を改変又はブロックし得る。

よって、前記遺伝子の転写は、当初の値の少なくとも50%減少するか、又は完全にブロックされ、翻訳も同様であり、3-OST-2及び-4レベルの減少をもたらす、よって異常リン酸化タウタンパク質の減少をもたらす。

小ヘアピンリボ核酸(shRNA)は、リンカーにより連結されたセンス鎖及びアンチセンス鎖のsiRNAを含んでなる二本鎖分子である。これら分子はヘアピンを形成し、リンカーが除去されてsiRNAが遊離される。

1つの有利な実施形態において、前記shRNAは、該shRNAの発現を可能にする核酸配列を含んでなるベクター中に含まれる。

【0050】

有利な実施形態において、本方法は、前記剤を投与するために、それ自体公知の遺伝子療法及び/又はアンチセンス核酸技術の方法を適用することを含んでなる。一般に、遺伝子療法は幾つかのアプローチを含む：変異遺伝子の分子置換、治療用タンパク質の合成を生じる新たな遺伝子の作製、及び組換え発現法又は薬剤による内因性細胞遺伝子発現のモジュレーション。遺伝子移入技法は詳細に記載されており(例えば、Behr Acc Chem Res 1993, 26: 274-278及びMulligan, Science 1993, 260: 926-931)、これには、(組換えウイルス、特にレトロウイルス及びレンチウイルスベクターのような)生物学的ベクター若しくはモデルリポソームを用いる直接遺伝子移入技法、或いはポリカチオンとのDNA共沈、化学物質(溶媒、界面活性剤、ポリマー、酵素)若しくは物理的手段(機械的、浸透圧性、熱的、電氣的ショック)による細胞膜摂動又は細胞膜透過性ペプチドを用いるトランスフェクションをベースにする技法が含まれる。中枢神経系への出生後遺伝子移入は詳細に記載されている(例えば、Wolff, Curr opin neurobiol 1993, 3:743-748を参照)。

【0051】

具体的には、本発明は、アンチセンス核酸療法により、すなわち、或る特定の決定的に重要な細胞へのアンチセンス核酸又はその誘導体の導入による不適切に発現した遺伝子又は欠陥遺伝子のダウンレギュレーション(例えば、Gillespie, DN&P 1992, 5: 389-395; Agrawal and Akhtar, Trends Biotechnol 1995, 13: 197-199; Crooke, Biotechnology 1992, 10: 882-6を参照)により神経変性疾患を治療又は予防する方法を特色とする。ハイブリダイゼーションストラテジとは別に、リボザイム、すなわち酵素として作用するRNA分子、疾患のメッセージを運ぶ破壊性RNA(destroying RNA)の適用もまた記載されている(例えば、Barinaga, Science 1993, 262: 1512-1514を参照)。好適な実施形態において、治

療用アンチセンス核酸又はその誘導体は、HS3ST2及び/又はHS3ST4をコードする遺伝子の転写物を指向する。対象者の中枢神経系、好ましくは脳の細胞をこのように治療することが好適である。細胞透過は、公知のストラテジ、例えばアンチセンス核酸及びその誘導体とキャリア粒子又は上記技法とを組み合わせることにより行うことができる。標的付けられた治療用オリゴデオキシヌクレオチドの投与ストラテジは、当業者に公知である(例えば、Wickstrom, Trends Biotechnol 1992, 10:281-287を参照)。幾つかの場合において、送達は、単に、頭蓋内(脳室内)適用により行うことができる。更なるアプローチは、アンチセンスRNAの細胞内発現に向けられる。このストラテジにおいて、細胞を、エキソソームで、標的核酸の或る領域に相補的なRNAの合成を導く組換え遺伝子で形質転換する。細胞内発現したアンチセンスRNAの治療的使用は、遺伝子療法と手続き上類似する。二本鎖RNAを使用して遺伝子の細胞内発現を調節するために最近開発された方法(RNA干渉(RNAi)としても知られる)は、核酸療法の別の効果的アプローチであり得る(Hannon, Nature 418: 244-251)。

10

【0052】

よって、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病又はアルツハイマー病とは異なるタウオパチーの治療は、ベクター又はエキソソームにより前記オリゴヌクレオチドを投与する遺伝子療法で行うことができる(van den Boorn JGら, Nat Biotechnol. 2011 Apr;29(4): 325-6)。

アルツハイマー病の治療はまた、第1療法として遺伝子療法を、第2療法として細胞回復を誘導する細胞外媒体のヘパリン模擬体による保護を含んでなる二重療法で行うことができる。

20

前記オリゴヌクレオチドは、0.1 ~ 1 mMの用量、特に0.5mMで、静脈内経路又は脳室内経路により投与することができる。

前記オリゴヌクレオチドはまた、別の経路、例えば経口経路、i.p.経路などにより、当該経路に適切な投薬量で投与することができる。

【0053】

前記少なくとも1つの剤はまた、小分子であり得、この表現により、ヘパリン及びヘパラン硫酸作用を阻害し得る分子が理解される。これは、タウタンパク質に立体構造変化を誘導してタウタンパク質の異常リン酸化をもたらすヘパリンの能力を阻害する。

プロタミン又は硫酸プロタミンはアルギニンに富む小さい核タンパク質であり、静脈内投与後に即時に作用するヘパリンのアンタゴニストである。

30

他の3-O-硫酸化インヒビター又はヘパラン硫酸スルホトランスフェラーゼインヒビター、特にRazi, Nら(J Biol Chem 1995, 270, 11267-75); Rath, V. L.ら(Drug Discov Today 2004, 9, 1003-11)又はSeko, A.ら(J Inorg Biochem 2009, 103, 1061-6)に記載のものを、この実施形態において使用することができる。

US20100048638に記載されるヘパラン硫酸及びヘパラン硫酸スルホトランスフェラーゼのインヒビターもまた使用することができる。

【0054】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記少なくとも1つの剤が、以下：

40

a)上記式(I)のヘパラン硫酸模擬体、特に式(II)のヘパラン硫酸模擬体、特にF6分子、CR36、HM 100又はHM 2602、又はフコイダン若しくはペントサンポリ硫酸、又はペンタサッカリド、例えばArixtra(登録商標)(フォンダパリヌクス)、フコイダン若しくはペントサンポリ硫酸、及び/又は低分子量ヘパリン、例えばエノキサパリン(Lovenox(登録商標))、及び/又は超低分子量ヘパリン、及び/又は

b)siRNA、例えば配列番号71で示されるセンスsiRNA及び配列番号72で示されるアンチセンスsiRNA、配列番号73で示されるセンスsiRNA及び配列番号74で示されるアンチセンスsiRNA、配列番号75で示されるセンスsiRNA及び配列番号76で示されるアンチセンスsiRNA、配列番号77で示されるセンスsiRNA及び配列番号78で示されるアンチセンスsiRNAからなるリストより選択されるsiRNA、又はモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド、特に配

50

列番号5及び配列番号6からなる群より選択されるモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド、及び/又は

c)小分子、プロタミン又は硫酸プロタミンからなる群より選択されるヘパリン及びヘパラン硫酸作用のインヒビターからなる群より選択される、神経変性疾患の治療又は予防に使用する上記組成物に関する。

【0055】

別の1つの観点において、本発明は、以下：

a)配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリングルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b)配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c)それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び/又は

d)前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は

e)ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び/又は

f)タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

のレベル及び/又は活性を、対象者から事前に得た生物学的流体サンプルにおいて測定し、前記レベル及び/又は前記活性を、既知の疾患又は健康状態を表すそれぞれの参照値と比較することを含んでなり、

前記遺伝子及び/又は前記転写産物及び/又は前記翻訳産物及び/又は前記ヘパラン硫酸、特に前記3-O-硫酸化ヘパラン硫酸及び/又は前記タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の少なくとも1つのレベル及び/又は活性が対象者サンプル中で上昇していることが神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)を示すか又は前記神経変性疾患を発症するリスクを示す、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するためのインビトロ方法に関する。

【0056】

よって、本発明者らは、神経変性疾患、特にアルツハイマー病では、3-OST-2(HS3ST2)及び/又は3-OST-4(HS3ST4)遺伝子の発現レベルが高度に上昇しており、よって3-O-硫酸化したHS又はヘパリン様HS構造物がより多くなることを見出した。

このように、配列番号1及び3で示される遺伝子の一方又は両方のレベル及び/又は活性が上昇しており、また、前記遺伝子の転写産物の一方又は両方のレベル及び/又は活性も、同様に前記遺伝子の翻訳産物、すなわち、配列番号2及び4で示されるタンパク質の一方又は両方のレベル及び/又は活性も上昇している。

3-OST-2及び-4は、ヘパラン硫酸の3-O-硫酸化を担うので、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベルもまた高度に上昇し、タウタンパク質の異常リン酸化をもたらすタウタンパク質の立体構造変化が誘導される。

よって、これら構成要素の少なくとも1つのレベル及び/又は活性が生物学的流体において参照値と比較して上昇していることの検出により、神経変性疾患、特にアルツハイマー病又はアルツハイマー病とは異なるタウオパチーの診断又は予後予測がもたらされる。

【0057】

1つの有利な実施形態において、生物学的流体は、任意の細胞培養物、特にニューロンの初代培養物の細胞外媒体であり、また血液、血漿、血清、尿又は脳脊髄液(CSF)でもある。

10

20

30

40

50

好適な実施形態において、HS3ST2及び/又はHS3ST4をコードする遺伝子の転写産物レベルの測定は、対象者から得たサンプルにおいて、対象者サンプルから抽出したRNAの逆転写により得たcDNAから該遺伝子特異配列を増幅するプライマーの組合せを使用して定量的PCR分析で行う。プライマーの組合せは本発明の「実施例」に示されるが、本発明に開示した配列から作製される他のプライマーもまた使用することができる。前記遺伝子に特異的なプローブを用いるノーザンブロットもまた適用可能である。チップベースのマイクロアレイ技術により転写産物を測定することが好適であり得る。これら技法は当業者に公知である(Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001; Schena M., Microarray Biochip technology, Eaton Publishing, Natick, MA, 2000を参照)。

10

【0058】

更に、HS3ST2及び/又はHS3ST4をコードする遺伝子の翻訳産物又は該翻訳産物のグリカン産物及び/又は該翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型のレベル及び/又は活性は、イムノアッセイ、活性アッセイ、クロマトグラフアッセイ、分光アッセイ、例えば質量分析、及び/又は結合アッセイを用いて検出することができる。これらアッセイは、前記タンパク質分子と抗タンパク質抗体との間の結合量を、抗タンパク質抗体又は該抗タンパク質抗体に結合する二次抗体のいずれかに付着した酵素、クロモ力学、放射活性、磁性又は発光標識を用いて測定することができる。加えて、他の高親和性リガンドも使用し得る。使用し得るイムノアッセイとしては、例えばELISA、ウェスタンブロット及び当業者に公知の他の技法が挙げられる(Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999、及びEdwards R, Immunodiagnosics: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford; England, 1999を参照)。これら全ての検出技法はまた、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、電子工学的バイオチップ又はタンパク質チップベース技術の形式で用い得る(Schena M., Microarray Biochip Technology, Eaton Publishing, MA, 2000を参照)。

20

【0059】

1つの有利な実施形態において、前記疾患の進行をモニターするために、対象者から或る期間にわたって採取した一連のサンプルにおいて、(i)HS3ST2及び/又はHS3ST4をコードする遺伝子の転写産物、及び/又は(ii)HS3ST2及び/又はHS3ST4をコードする遺伝子の翻訳産物、及び/又は(iii)前記転写若しくは翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は(iv)HS3ST2及び/又はHS3ST4をコードする遺伝子の翻訳産物に由来するグリカン産物又はこのグリカン産物のフラグメントのレベル若しくは活性又はレベル及び活性の両方を比較する。更に好適な実施形態において、前記対象者は、前記サンプルの1以上を集める前に治療を受ける。更に別の好適な実施形態において、前記レベル及び/又は活性は対象者の治療の前後に測定する。

30

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病を含むタウオパチーである上記インビトロ方法に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患が上記タウオパチーであり、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質のレベルがそれぞれの参照値に比べて少なくとも10%上昇しているインビトロ方法に関する。

40

【0060】

参照値は、タウオパチーにも、別の神経変性疾患にも、タウタンパク質の異常リン酸化のレベルに影響する疾患にも罹患していない患者で得られた値で与えられる。

参照値は、種々の形態をとり得る。参照値は、単一のカットオフ値、例えばメジアン若しくは平均、又は集団の75分位、90分位、95分位若しくは99分位であり得る。参照値は、比較群に基づいて確立することができ、例えば、或る規定群におけるリスクは別の規定群におけるリスクの2倍であるという具合である。参照値は範囲であり得、例えば検査集団は幾つかの群(例えば、低リスク群、中リスク群及び高リスク群)に等分(又は不等分)されるか、又は四等分される(第1四分位はリスクが最も低い個体群であり、第4四分位はリ

50

スクが最も高い個体群である)。

所定値は、選択した特定の集団の間で、習慣、民族性、遺伝学などに依存して変化し得る。

【0061】

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化は参照値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化は参照値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化は参照値と比較して少なくとも40%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化は参照値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化は参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

【0062】

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化は参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化は参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化は参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化は参照値と比較して少なくとも100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は、参照値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇しており、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は、前記それぞれの参照値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇している。

【0063】

1つの有利な実施形態において、本発明は、以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパラン硫酸グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び/又は

d) 前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は

e) ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び/又は

f) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

のレベル及び/又は活性を、対象者から事前に得た生物学的流体サンプルにおいて測定し、前記レベル及び/又は前記活性を、既知の疾患又は健康状態を表すそれぞれの参照値と比較することを含んでなり、

但し、測定された活性及び/又はレベルが以下：

ヘパラン硫酸、又は

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

のものであるとき、ヘパラン硫酸の活性及び/又はレベルとタウタンパク質の異常リン酸

10

20

30

40

50

化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルとの両方が測定されるか、又は前記遺伝子、前記遺伝子の前記転写産物、前記遺伝子の前記翻訳産物又は前記遺伝子若しくは前記転写産物若しくは前記翻訳産物の前記フラグメント若しくは誘導体若しくは変異型から選択される少なくとも1つの他の要素の活性及び/又はレベルもまた測定され、前記遺伝子及び/又は前記転写産物及び/又は前記翻訳産物及び/又は前記ヘパラン硫酸、特に前記3-0-硫酸化ヘパラン硫酸及び/又は前記タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の少なくとも1つのレベル及び/又は活性が対象者サンプル中で上昇していることが神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)を示すか又は前記神経変性疾患を発症するリスクを示す、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するためのインピトロ方法に関する。

【0064】

よって、この実施形態において、下記のリストに挙げられる幾つの場合があり得る。すなわち、前記活性及び/又はレベルの測定は、下記：

- a)、b)、c)又はd)から選択される1つの要素のみ(したがって、e)のみ又はf)のみの活性及び/又はレベルは排除されることを意味する)；

- 以下の組合せから選択される2つの要素：a-b、a-c、a-d、a-e、a-f、b-c、b-d、b-e、b-f、c-d、c-e、c-f、d-e、d-f又はe-f；

- 以下から選択される3つの要素：a-b-c、a-b-d、a-b-e、a-b-f、a-c-d、a-c-e、a-c-f、a-d-e、a-d-f、a-e-f、b-c-d、b-c-e、b-c-f、b-d-e、b-d-f、b-e-f、c-d-e、c-d-f又はd-e-f；

- 以下から選択される4つの要素：a-b-c-d、a-b-c-e、a-b-c-f、a-c-d-e、a-c-d-f、a-d-e-f、b-c-d-e、b-c-d-f、c-d-e-f；

- 以下から選択される5つの要素：a-b-c-d-e、a-b-c-d-f、a-b-d-e-f、a-c-d-e-f；

- 以下から選択される6つの要素：a-b-c-d-e-f

からなる。

【0065】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がタウオパチーであり、前記生物学的流体がCSFであり、対象者における以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-0-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される前記遺伝子、及び

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-0-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の前記転写産物、及び

c) 配列番号2及び4でそれぞれ示される前記遺伝子の前記翻訳産物、及び

d) 前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び

e) ヘパラン硫酸、特に3-0-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-0-硫酸化ヘパラン硫酸二糖の活性及び/又はレベルがそれぞれの参照値と実質的に同じであり、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルが対象者においてそれぞれの参照値と比較して上昇しており、特に少なくとも10%上昇している上記インピトロ方法に関する。

【0066】

アルツハイマー病以外のタウオパチーにおいて、異常なタウのリン酸化は、MAPT遺伝子における変異又は欠失に起因し、この変異又は欠失がタウタンパク質の異常リン酸化を誘導し、この場合、3-OSTの増加は観察されない。散発性アルツハイマー病では、タウタンパク質に変異又は欠失は存在せず、3-OSTの増加が観察される。よって、3-OSTの検出によ

10

20

30

40

50

り、遺伝性タウオパチー及び散発性アルツハイマー病を含む認知症間の鑑別的診断及び/又は予後予測が可能になる。

よって、上記他の構成要素のいずれについても上昇したレベル及び/又は活性が検出されず、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質のみが検出されることで、アルツハイマー病以外のタウオパチーの鑑別的診断及び/又は予後予測が可能になる。

表現「実質的に同じ」は、測定レベルが、選択した特定の集団の間での、習慣、民族性、遺伝学などに依存する個体変動に起因して、参照値に対して変動し得ることを意味する。したがって、測定レベルは、参照値の $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 又は $\pm 2.5\%$ であり得る。

【0067】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病である上記インビトロ方法に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇している上記インビトロ方法に関する。

この実施形態において、3-OST-2遺伝子のみが前記疾患に関与し、3-OST-4遺伝子のレベルは実質的に変化しない。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも200%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも300%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも400%上昇している。

【0068】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇している上記インビトロ方法に関する。

この実施形態において、3-OST-4遺伝子のみが前記疾患に関与し、3-OST-2遺伝子のレベルは実質的に変化しない。

1つの有利な実施形態において、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも200%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも300%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも400%上昇している。

【0069】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、リアルタイムPCRで測定するとき、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルが少なくとも100%上昇し、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルが少なくとも100%上昇している上記インビトロ方法に関する。

この実施形態において、3-OST-2及び3-OST-4遺伝子の両方が前記疾患に関与している。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも200%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも300%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、

10

20

30

40

50

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも400%上昇しており、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも400%上昇している。

【0073】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも50%上昇している上記インビトロ方法に関する。。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも100%上昇している。

【0074】

ヒトCSF中の3-OST-2の基礎値は60pg/mlである。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも100%上昇している。

【0075】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇している上記インビトロ方法に関する。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベル

10

20

30

40

50

は、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも100%上昇している。

10

【0076】

ヒトCSF中の3-OST-4の基礎値は60pg/mlである。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも80%上昇している。

20

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも100%上昇している。

【0077】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ELISA又はウェスタンブロットで測定するとき少なくとも50%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇している上記インビトロ方法に関する。

30

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも50%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも50%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

40

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも50%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも50%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

50

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも90%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇している。

【0082】

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇している。

【0083】

1つの有利な実施形態において、3-OST-2の参照値はヒトCSF中の3-OST-2の基礎値で、60pg/mlであり、3-OST-4の参照値はヒトCSF中の3-OST-2の基礎値で、60pg/mlである。

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、

配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは少なくとも50%上昇しており、及び/又は

配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇しており、

ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性を測定することを更に含んでなり、前記レベル及び/又は活性が参照値と比較して少なくとも50%上昇していることがアルツハイマー病を示す上記インビトロ方法に関する。

【0084】

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して70%上昇している。

10

20

30

40

50

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して100%上昇している。

【0085】

コントロールヒト海馬中のヘパラン硫酸の基礎レベルはジメチルメチレンブルー (DMMB) アッセイ (Huynhら Neurobiol Aging. 2012 33(5):1005.e11-22) で測定するとき、約0.5 µg/mg湿潤組織である。

参照値は基礎レベルであると考え、アルツハイマー病における前記レベルは海馬及び皮質において少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬及び皮質において基礎レベル及び/又は活性と比較して60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬及び皮質において基礎レベル及び/又は活性と比較して70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬及び皮質において基礎レベル及び/又は活性と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬及び皮質において基礎レベル及び/又は活性と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬及び皮質において基礎レベル及び/又は活性と比較して100%上昇している。

【0086】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、

配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは少なくとも50%上昇しており、及び/又は

配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇しており、

タウタンパク質に結合し得るヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性を測定することを更に含んでなり、前記レベル及び/又は活性が参照値と比較して少なくとも50%上昇していることがアルツハイマー病を示す上記インビトロ方法に関する。

幾つかの硫酸化グリコサミノグリカン及び模擬体は、タウに結合することができ、これらには、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸及び他の化学合成の硫酸化多糖、例えばデキストラン硫酸及びペントサン硫酸が含まれる。

【0087】

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して100%上昇している。

10

20

30

40

50

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して110%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して120%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して130%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して140%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して150%以上上昇している。

10

【0088】

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は、ヒトの海馬、皮質、CSF又は血液において測定される。

コントロールヒト海馬中のヘパラン硫酸の基礎レベルは、Huynhら (Neurobiol Aging. 2012 33(5):1005.e11-22) に記載されるジメチルメチレンブルー (DMMB) アッセイで測定するとき、約0.5 µg/mg湿潤組織である。

よって、参照値は基礎レベルであると考え、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は、アルツハイマー病において、海馬で50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して60%上昇している。

20

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して110%上昇している。

30

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して120%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して130%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して140%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して150%以上上昇している。

【0089】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、

40

配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは少なくとも50%上昇しており、及び/又は

配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇しており、

3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性を測定することを更に含んでなり、

50

前記レベルが参照値と比較して少なくとも50%上昇していることがアルツハイマー病を示す上記インビトロ方法に関する。

【0090】

よって、本発明者らは、ヘパラン硫酸のなかでも、特にタウタンパク質に結合し得るヘパラン硫酸、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸が高度に上昇しており、よってアルツハイマー病の診断が可能になることを見出した。

アルツハイマー病における前記上昇は、海馬、皮質、CSF及び血液で観察される。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して110%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して120%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して130%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して140%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して150%以上上昇している。

【0091】

コントロールヒト海馬中の3-O-硫酸化ヘパラン硫酸の基礎レベルは、ジメチルメチレンブルー(DMMB)アッセイで測定するとき、約1 ng/mg湿潤組織である。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して110%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して120%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して130%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して140%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して150%以上上昇している。

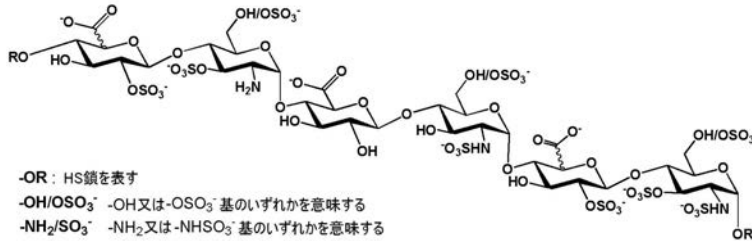
【0092】

1つの有利な実施形態において、前記3-O-硫酸化ヘパラン硫酸は、トリ硫酸化GlcA2S/IdoA2S-GlcNS3S及びテトラ硫酸化GlcA2S/IdoA2S-GlcNS3S6S単位形態(これらは、ヘパリナーゼI、II及びIIIによるヘパラン硫酸の消化後に得られるUA2S-GlcNS3S及びUA2S-GlcNS3S6Sに相当する)から選択され、生物学的流体はCSFである。亜硝酸処理(Huynhら Neurobiol Aging. 2012 33(5):1005.e11-22)のような化学的方法もまた、HS二糖を製造するために使用することができる。

【0093】

3-O-硫酸化ヘパラン硫酸の代表的構造は以下のとおりである：

【化3】



10

【0094】

タウタンパク質の異常リン酸化は、3-O-硫酸化HSにより誘導される立体構造変化の後に起こり、AD患者脳におけるHS GlcA2S/IdoA2S-GlcNS3S6S(テトラS単位)及びGlcA2S/IdoA2S-GlcNS3S(トリS単位)の形成は、リン酸化事象に先行し、よってこれら種はAD患者のCSFで見出される。

20

これらは、異常リン酸化がタウタンパク質遺伝子中の変異の結果である他のタウオパチーでは、存在しないか、ADより低いレベルで存在するはずである。よって、テトラS及びトリS二糖の検出は、タウオパチーとAD(変異依存性タウリン酸化を伴うものを含む)との間の鑑別的診断及び/又は予後予測に使用することができる。

【0095】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、

配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

30

配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは少なくとも50%上昇しており、及び/又は配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇しており、及び/又はヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも50%上昇しており、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質のレベル及び/又は活性を測定することを更に含んでなり、前記レベルがそれぞれの参照値と比較して少なくとも10%上昇していることがアルツハイマー病を示す上記インビトロ方法に関する。

40

アルツハイマー病において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベルは上昇しており、総タウタンパク質のレベルも同様である。

【0096】

したがって、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル若しくは総タウタンパク質のレベル又はその両方を測定することにより、アルツハイマー病の診断又は予後予測又は経過観察が可能になる。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも30%上昇している。

50

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも40%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

【0097】

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも40%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇しており、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇している。

【0098】

本発明は、3-OST-2酵素がAD患者においてCSF中に存在するという結果を示し、該タンパク質のレベルが同一CSFサンプル中の過リン酸化タウのレベルと相関していることを示す。このことにより、該酵素は、タウタンパク質と同様、細胞外空間に見出すことができ、よってCSFに移動することが証明され、そのレベルの程度又は活性の程度がAD病の診断及び/又は予後予測マーカーとして使用できることが確証される。

【0099】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、前記生物学的流体がCSFであり、対象者における以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少

10

20

30

40

50

なくとも1つ、及び

c)それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物、及び

d)ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び

e)タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルがそれぞれの参照値と比較して上昇している上記インビトロ方法に関する。

【0100】

前記遺伝子及び前記遺伝子の前記転写産物及び前記遺伝子の前記翻訳産物及びHSのレベル及び/又は活性は、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の上昇の前に、上昇し得ることに留意すべきである。

10

アルツハイマー病には、タウタンパク質の異常リン酸化だけでなく、3-OST-2及び/又は3-OST-4遺伝子、前記遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、ヘパラン硫酸、特にタウタンパク質に結合し得るヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸もまた関与している。

このことにより、タウオパチー間の鑑別的診断及び/又は予後予測が可能になる。

よって、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性及び上記他の構成要素の少なくとも1つのレベル及び/又は活性が上昇していることを検出することにより、アルツハイマー病の診断及び/又は予後予測が可能になる。

【0101】

20

本発明の実施例は、HSの特異的硫酸化を担う酵素(3-OST-2及び4)がADの脳及びCSFで上昇していること、及びこれら酵素活性に由来するHSがタウの異常リン酸化にインビトロ及びインビボで関与することを証明する。実施例はまた、ヘパリン中の3-O-硫酸化基がインビトロで異常タウリン酸化を誘導し得ることを示す。

実施例は、GSK-3 によるタウタンパク質のリン酸化がキナーゼ反応媒体に使用する多糖又はオリゴ糖中の3-O-スルフェート基の存在に依存することを具体的に示す。更に、本発明は、使用したヘパリン様物質のいずれかに結合するのはGSK-3 酵素ではなく、タウタンパク質自体であることを示し、立体構造変化によりリン酸化部位がキナーゼ活性に提示されることを示唆する。よって、3-O-硫酸化HSは、タウタンパク質と相互作用して、キナーゼの存在下で、そのリン酸化を調節する。

30

前記活性及び/又はレベルはまた、前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導體又は変異型のものであり得ることに留意すべきである。

【0102】

ヒトCSF中のpタウの基礎値は約60pg/ml以下であり、総タウについては約450pg/ml以下である。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも40%上昇している。

40

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活

50

性は基礎値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも100%上昇している。

【0103】

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも10%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも40%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇しており、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇している。

【0104】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がタウオパチー、特にアルツハイマー病であり、前記生物学的流体はCSFであり、以下：

a)ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び

b)タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルが対象者においてそれぞれの参照値と比較して上昇しており、特に少なくとも10%上昇しており、前記ヘパラン硫酸は、リン酸化タウタンパク質及び/又は総タウに、少なくとも10%の比で結合し得る上記インビトロ方法に関する。

本発明者らは、タウオパチー、特にアルツハイマー病において、ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖の活性及び/又はレベル並びに印タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルがCSFで上昇しているだけでなく、CSFに存在するHSも総タウに結合する最高能力を有し、よってタウオパチー、特にアルツハイマー病を表すことを更に見出した。

【0105】

1つの有利な実施形態において、

タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は、基礎値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇しており、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は、基礎値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇しており、

ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖の

10

20

30

40

50

活性及び/又はレベルは、基礎値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇しており、

リン酸化タウタンパク質及び/又は総タウに結合し得るHSの比は、10%~100%の間であり、特に少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%である。

【0106】

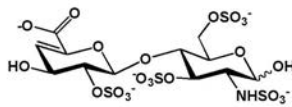
1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、前記生物学的流体が血漿であり、ヘパラン硫酸がヘパラン硫酸のヘパリナーゼI、II及びIII(I~III)消化後に得られるグルコサミンの3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖である上記インビトロ方法に関する。

10

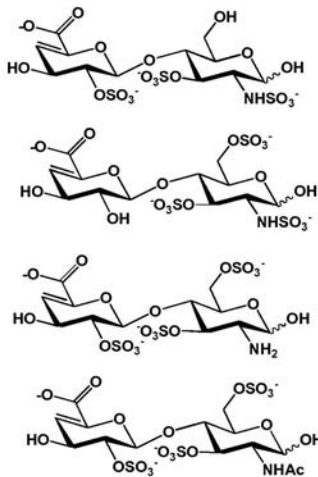
ヘパリナーゼI、II及びIII消化により得られる3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖は、例えば、以下の化合物に相当する(これらに限定されない)：

【化4】

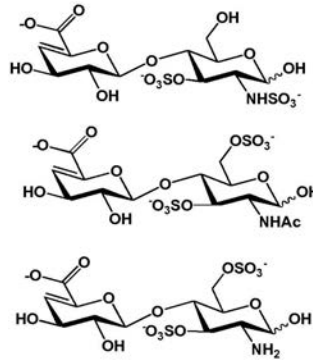
テトラ硫酸化二糖



トリ硫酸化二糖



ジ硫酸化二糖



20

30

【0107】

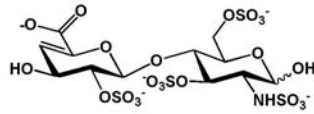
本発明の別の利点は、CSFサンプルより採集が容易である血漿サンプルで非常に容易に実施することができる、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するためのインビトロ方法を提供することである。

1つの有利な実施形態において、上記のリストから選択される二糖の少なくとも1つが、アルツハイマー病を有する患者の血漿中に存在する；特に、下記の2つの二糖の少なくとも1つが血漿中に存在する。

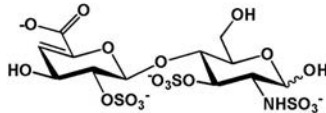
40

【化5】

テトラ硫酸化二糖



トリ硫酸化二糖



【0108】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、前記生物学的流体が血漿であり、翻訳産物の前記誘導体がヘパラン硫酸(グルコサミン) 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び/又は4の分解産物であり、ヘパラン硫酸がヘパラン硫酸のヘパリナーゼI~III消化後に得られる3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖であり、翻訳産物の前記誘導体のレベルと3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖のレベル及び/又は活性との両方が参照値又は基礎値と比較して上昇していることが、アルツハイマー病を示す上記インビトロ方法に関する。

【0109】

別の1つの観点において、本発明は、以下：

配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、のレベル及び/又は活性を、対象者から得た生物学的流体サンプルにおいて認識・検出し、前記サンプルで得られた前記レベル及び/又は活性を、既知の疾患又は健康状態を表すコントロールで得られたものと比較する手段からなる、対象者における神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)を診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は前記疾患を発症する対象者の性向若しくは素因を決定するためのキットに関する。

【0110】

前記少なくとも1つの遺伝子転写産物又は前記少なくとも1つの遺伝子翻訳産物を認識する手段は、例えば、抗体であり得、そのことによりElisaアッセイを行うことが可能になる。

【0111】

本発明は、HS3ST2及び/若しくはHS3ST4をコードする遺伝子の翻訳産物又は該タンパク質の酵素活性のグリカン産物又はそれらのフラグメント若しくは誘導体若しくは変異型である免疫原と特に免疫反応性である抗体を特色とする。免疫原は、前記遺伝子翻訳産物の免疫原性又は抗原性のエピートプ又は部分を含んでなり得る。ここで、前記免疫原性又は抗原性部分はポリペプチドであり、該ポリペプチドは動物において抗体を惹起し、該ポリペプチドには前記抗体が免疫学的に特異的に結合する。抗体を作製する方法は、当該分野において周知である(Harlowら, Antibodies, A Laboratory Manual, Vold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, new York, 1988)。用語「抗体」は、本発明で使用する場合、当該分野において公知の全ての形態の抗体を包含し、例えば、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、組換え、抗イディオタイプ、ヒト化又は単鎖抗体並びにそれらのフラグメントである(Dubel and Breitling, Recombinant Antibodies, Wiley-Liss, New York, NY, 1999)。ファージディスプレイ技術により製造された抗体もまた含まれる。本発明の抗体は、例えば従来技術に基づく種々の診断及び治療法、例えば、酵素イムノアッセイ(例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ、ELISA)、ラジオイムノアッセイ、化

10

20

30

40

50

学発光イムノアッセイ、ウェスタンブロット、免疫沈降及び抗体マイクロアレイで有用である(Harlow and Lane, Using Antibodies: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York, 1999、及びEdwards R; Immunodiagn ostics: A practical Approach, Oxford University Press, Oxford, England, A999)。これら方法には、HS3ST2及び/又はHS3ST4をコードする遺伝子の翻訳産物又は該タンパク質の酵素活性のグリカン産物又はそれらのフラグメント若しくは誘導体若しくは変異型の検出が含まれる。

【0112】

配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ及び/又はそれぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つのレベルが健康状態を表すコントロールと比較して上昇していることが、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を示す。

10

【0113】

1つの有利な実施形態において、本発明は、ヘパラン、及び/又はヘパラン硫酸のヘパリナーゼI~III消化後に得られるグルコサミンの3位で硫酸化されたヘパラン硫酸二糖を認識・検出する手段を更に含んでなる上記キットに関する。

配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ及び/又はそれぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つのレベル及びヘパラン及び/又はヘパラン硫酸のヘパリナーゼI~III消化後に得られるグルコサミンの3位で硫酸化されたヘパラン硫酸二糖のレベルが健康状態を表すコントロールと比較して上昇していることが、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を示す。

20

【0114】

1つの有利な実施形態において、本発明は、以下：

配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つのレベル及び/又は活性を、対象者から得た生物学的流体サンプルにおいて認識・検出する手段、及び

30

任意に、ヘパラン硫酸及び/又はヘパラン硫酸のヘパリナーゼI~III消化後に得られるグルコサミンの3位で硫酸化されたヘパラン硫酸二糖を認識・検出する手段、からなり、更に、

前記対象者から得たサンプルにおいて、タウタンパク質のリン酸化のレベルを測定する手段、及び

前記サンプルで得られた前記レベルを、既知の疾患又は健康状態を表すコントロールで得られたものと比較する手段、及び

異常リン酸化タウレベル及び/又は総タウレベル並びに配列番号2及び配列番号4の翻訳産物レベルを、既知の疾患又は健康状態を表すコントロールと比較する手段を含んでなるキットに関する。

40

【0115】

配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ及び/又はそれぞれタウレベル及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ及び任意にヘパラン及び/又はヘパラン硫酸のヘパリナーゼI~III消化後に得られるグルコサミンの3位で硫酸化されたヘパラン硫酸二糖及び異常リン酸化タウのレベルが健康状態を表すコントロールと比較して上昇していることが、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を示す。

50

【0116】

以下：

- a) 哺乳動物又は魚類、特に神経変性疾患に罹患した哺乳動物から事前に採集した生物学的流体サンプルを、試験化合物と接触させ、
- b)
- i. 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は
- ii. 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は
- iii. それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び/又は
- iv. 前記遺伝子又は転写若しくは翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は
- v. ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖
- vi. タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルを測定し、
- c) 神経変性疾患を有する哺乳動物から事前に採集した、前記化合物に接触させていないコントロールの生物学的流体サンプル中の活性及び/又はレベルを測定し、
- d) 接触させた生物学的流体サンプル中の前記活性及び/又はレベルの差と、非接触の生物学的流体サンプル中のものとの比較することを含んでなり、
- 接触させた細胞の前記活性及び/又はレベルの変化が、試験化合物が前記疾患のモジュレーターであることを示す、神経変性疾患、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)のモジュレーターについてのインビトロスクリーニング方法。

10

20

【0117】

よって、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質のレベルのみを減少させる化合物は、タウオパチーのモジュレーターである。

- タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質のレベル

30

- 3-OST-2及び/又は4遺伝子及び/又はその転写産物及び/又はその翻訳産物及び/又はヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖を減少させる化合物は、アルツハイマー病のモジュレーターである。

【0118】

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸は、ヘパラン硫酸のヘパリナーゼI~II消化後に得られるグルコサミンの3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖である。

前記生物学的流体は、任意の細胞培養物、特にニューロンの初代培養物の細胞外媒体であり得、また血液、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液(CSF)でもあり得る。

1つの有利な実施形態において、前記哺乳動物はヒト又はマウス、例えばSAMP8マウス及び/又はADの3xTg-ADマウスモデルである、神経変性疾患、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)のモジュレーターについての上記インビトロスクリーニング法。

40

1つの有利な実施形態において、前記魚類はゼブラフィッシュである、神経変性疾患、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)のモジュレーターについての上記インビトロスクリーニング法。

【0119】

別の1つの観点において、本発明は、以下：

- a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

50

b) 配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパラン硫酸(グルコサミン) 3-O-スルホトラン
スフェラーゼ 2 及び 4 のイソフォームをそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群
より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも 1 つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号 2 及び 4 で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも 1 つ、及び/
又は

d) 前記転写若しくは翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は

e) ヘパラン硫酸、特に 3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ 3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖
、及び/又は

f) 異常リン酸化タウタンパク質及び/又は総タウタンパク質

のレベル及び/又は活性を、対象者から得たサンプルにおいて測定し、前記レベル及び/又は
は前記活性を、既知の疾患又は健康状態を表すそれぞれの参照値と比較することを含んで
なり、

前記転写産物又は前記翻訳産物又はヘパラン硫酸、特に 3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわ
け 3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖又は異常リン酸化タウタンパク質の少なくとも 1 つのレ
ベル及び/又は活性が対象者サンプル中で上昇していることが神経変性疾患、有利にはタウ
オパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)を示
すか又は前記神経変性疾患を発症するリスクを示す、対象者における神経変性疾患の診断
若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大
したリスクにあるかどうかを決定するための方法に関する。

【0120】

この実施形態において、レベル及び/又は活性はインピボで測定される。

対象者は、哺乳動物、例えばヒト若しくはマウス、又は魚類であり得る。

よって、本発明者らは、神経変性疾患、特にアルツハイマー病では、3-Ost-2及び/又は
3-Ost-4遺伝子の発現レベルが高度に上昇しており、HS鎖のより高度な 3-O-硫酸化又はヘ
パリン様 HS 構造体をもたらすことを見出した。

このように、配列番号 1 及び 3 で示される遺伝子の一方又は両方のレベル及び/又は活
性が上昇しており、また、前記遺伝子の転写産物の一方又は両方のレベル及び/又は活性
も、同様に前記遺伝子の翻訳産物、すなわち、配列番号 2 及び 4 で示されるタンパク質の
一方又は両方のレベル及び/又は活性も上昇している。

3-Ost-2及び-4は、ヘパラン硫酸の 3-O-硫酸化を担うので、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸の
レベルもまた高度に上昇し、タウタンパク質の異常リン酸化をもたらすタウタンパク質の
立体構造変化が誘導される。

よって、これら構成要素の少なくとも 1 つのレベル及び/又は活性が対象者で上昇して
いることの検出により、神経変性疾患、特にアルツハイマー病又はタウオパチーの診断又
は予後予測がもたらされる。

【0121】

1 つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がタウオパチーである、
対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者
が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法
に関する。

1 つの有利な実施形態において、本発明は、タウタンパク質のリン酸化及び/又は総タ
ウタンパク質のレベルが参照値と比較して少なくとも 10% 上昇している、対象者における
神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性
疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法に関する。

参照値は、種々の形態をとり得る。参照値は、単一のカットオフ値、例えばメジアン若
しくは平均、又は集団の 75 分位、90 分位、95 分位若しくは 99 分位であり得る。参照値は、
比較群に基づいて確立することができ、例えば、或る規定群におけるリスクは別の規定群
におけるリスクの 2 倍であるという具合である。参照値は範囲であり得、例えば検査集団
は幾つかの群(例えば、低リスク群、中リスク群及び高リスク群)に等分(又は不等分)され
るか、又は四等分される(第 1 四分位はリスクが最も低い個体群であり、第 4 四分位はリ

10

20

30

40

50

スクが最も高い個体群である)。

所定値は、選択した特定の集団の間で、習慣、民族性、遺伝学などに依存して変化し得る。

【0122】

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも40%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

【0123】

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも40%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇しており、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇している。

【0124】

別の観点において、本発明は、以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパラン硫酸(グルコサミン) 3-O-スルホトラン

10

20

30

40

50

スフェラーゼ 2 及び 4 のイソフォームをそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも 1 つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号 2 及び 4 で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも 1 つ、及び/又は

d) 前記転写若しくは翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は

e) ヘパラン硫酸、特に 3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ 3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び/又は

f) 異常リン酸化タウタンパク質及び/又は総タウタンパク質

のレベル及び/又は活性を、対象者から得たサンプルにおいて測定し、前記レベル及び/又は前記活性を、既知の疾患又は健康状態を表すそれぞれの参照値と比較することを含んでなり、

但し、測定された活性及び/又はレベルが、以下：

ヘパラン硫酸、又は

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

のものであるとき、ヘパラン硫酸の活性及び/又はレベルとタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルとの両方が測定されるか、又は前記遺伝子、前記遺伝子の前記転写産物、前記遺伝子の前記翻訳産物又は前記遺伝子若しくは前記転写産物若しくは前記翻訳産物の前記フラグメント若しくは誘導体若しくは変異型から選択される少なくとも 1 つの他の要素の活性及び/又はレベルもまた測定され、前記転写産物又は前記翻訳産物又はヘパラン硫酸、特に 3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ 3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖又は異常リン酸化タウタンパク質の少なくとも 1 つのレベル及び/又は活性が対象者サンプル中で上昇していることが神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)を示すか又は前記神経変性疾患を発症するリスクを示す、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための方法に関する。

【0125】

1 つの有利な実施形態において、本発明は、前記生物学的流体が CSF であり、対象者における以下：

a) 配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ 2 及び 4 をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される前記遺伝子、及び

b) 配列番号 1 及び配列番号 3 で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の前記転写産物、及び

c) 配列番号 2 及び 4 でそれぞれ示される前記遺伝子の前記翻訳産物、及び

d) 前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び

e) ヘパラン硫酸、特に 3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ 3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖の活性及び/又はレベルがそれぞれの参照値と実質的に同じであり、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルが対象者において参照値と比較して上昇しており、特に少なくとも 100% 上昇している、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法に関する。

【0126】

アルツハイマー病以外のタウオパチーには、タウタンパク質の異常リン酸化のみが関与し、このことによりタウオパチー間の鑑別的診断及び/又は予後予測が可能になる。

よって、上記他の構成要素のいずれについても上昇したレベル及び/又は活性が検出されず、タウタンパク質の異常リン酸化のみが検出されることで、アルツハイマー病以外の

タウオパチーの診断及び/又は予後予測が可能になる。

表現「実質的に同じ」は、測定レベルが、選択した特定の集団の間での、習慣、民族性、遺伝学などに依存する個体変動に起因して、参照値に対して変動し得ることを意味する。したがって、測定レベルは、参照値の±10%、±5%又は±2.5%であり得る。

【0127】

ヒトCSF中のpタウの基礎値は約60pg/ml以下であり、総タウについては約450pg/ml以下である。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも40%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも100%上昇している。

【0128】

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも10%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも40%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇しており、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇して

10

20

30

40

50

いる。

【0129】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病である、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルが、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇している、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法に関する。

この実施形態において、3-OST-2遺伝子のみが前記疾患に関与し、3-OST-4遺伝子のレベルは実質的に変化しない。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも200%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも300%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも400%上昇している。

【0130】

1つの有利な実施形態において、本発明は、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルが、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇している、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法に関する。

この実施形態において、3-OST-4遺伝子のみが前記疾患に関与し、3-OST-2遺伝子のレベルは実質的に変化しない。

1つの有利な実施形態において、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも200%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも300%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも400%上昇している。

【0131】

1つの有利な実施形態において、本発明は、リアルタイムPCRで測定するとき、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルが少なくとも100%上昇し、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルが少なくとも100%上昇している、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法に関する。

この実施形態において、3-OST-2及び3-OST-4遺伝子の両方が前記疾患に関与している。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも200%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも300%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルは、リアルタイムPCRで測定するとき少なくとも400%上昇している。

10

20

30

40

50

る。

【0135】

1つの有利な実施形態において、本発明は、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルが、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇している、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法に関する。

当業者に周知の他の方法もまた、前記測定に使用することができる。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、少なくとも60%上昇している。

10

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、少なくとも90%上昇している。

20

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、少なくとも100%上昇している。

【0136】

ヒトCSF中の3-OST-2の基礎値は60pg/mlである。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも70%上昇している。

30

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも100%上昇している。

40

【0137】

1つの有利な実施形態において、本発明は、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルが、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇している、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法に関する。

当業者に周知の他の方法もまた、前記測定に使用することができる。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、少なくとも60%上昇している。

50

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、少なくとも100%上昇している。

10

【0138】

ヒトCSF中の3-Ost-4の基礎値は60pg/mlである。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも70%上昇している。

20

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、CSFにおいてウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、前記基礎レベルと比較して少なくとも100%上昇している。

【0139】

30

1つの有利な実施形態において、本発明は、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルが、ELISA又はウェスタンブロットで測定するとき少なくとも50%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルが、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇している、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法に関する。

当業者に周知の他の方法もまた、前記測定に使用することができる。

1つの有利な実施形態において、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、参照値と比較して少なくとも50%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

40

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも50%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも50%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

50

レベルは参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも90%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも90%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇している。

【0144】

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき、配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇しており、配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは参照値と比較して少なくとも100%上昇している。

【0145】

1つの有利な実施形態において、3-OST-2の参照値はヒトCSF中の3-OST-2の基礎値で、60pg/mlであり、3-OST-4の参照値はヒトCSF中の3-OST-2の基礎値で、60pg/mlである。

1つの有利な実施形態において、本発明は、ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性を測定することを更に含んでなり、前記レベル及び/又は活性が参照値と比較して少なくとも50%上昇していることがアルツハイマー病を示す、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法の1つに関する。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と

10

20

30

40

50

比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して100%上昇している。

【0146】

コントロールヒト海馬中のヘパラン硫酸の基礎レベルはジメチルメチレンブルー (DMMB) アッセイ (Huynhら Neurobiol Aging. 2012 33(5):1005.e11-22) で測定するとき、約0.5 μ g/mg湿潤組織である。参照値は基礎レベルであると考え、アルツハイマー病における前記レベルは海馬及び皮質において少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬及び皮質において基礎レベル及び/又は活性と比較して60%上昇している。

10

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬及び皮質において基礎レベル及び/又は活性と比較して70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬及び皮質において基礎レベル及び/又は活性と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬及び皮質において基礎レベル及び/又は活性と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬及び皮質において基礎レベル及び/又は活性と比較して100%上昇している。

【0147】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、

20

配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは少なくとも50%上昇しており、及び/又は

配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇しており、

タウタンパク質に結合し得るヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性を測定することを更に含んでなり、前記レベル及び/又は活性が参照値と比較して少なくとも50%上昇していることがアルツハイマー病を示す上記インビトロ方法に関する。

30

幾つかの硫酸化グリコサミノグリカン及び模擬体は、タウに結合することができ、これらには、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸及び化学合成の他の硫酸化多糖、例えばデキストラン硫酸及びペントサン硫酸が含まれる。

【0148】

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して70%上昇している。

40

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して110%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して120%上昇している。

50

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して130%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して140%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して150%以上上昇している。

【0149】

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は、ヒト海馬、皮質、CSF又は血液において測定される。

コントロールヒト海馬中のヘパラン硫酸の基礎レベルは、Huynhら (Neurobiol Aging. 2012 33(5):1005.e11-22) に記載されるジメチルメチレンブルー (DMMB) アッセイで測定するとき、約0.5 µg/mg湿潤組織である。

よって、参照値は基礎レベルであると考え、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は、アルツハイマー病において、海馬で50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して110%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して120%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して130%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して140%上昇している。

1つの有利な実施形態において、ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して150%以上上昇している。

【0150】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記神経変性疾患がアルツハイマー病であり、

配列番号1で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号3で示される遺伝子の転写産物のレベルはリアルタイムPCRで測定するとき少なくとも100%上昇しており、及び/又は

配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは少なくとも50%上昇しており、及び/又は

配列番号4で示される前記遺伝子の翻訳産物のレベルは、ウェスタンブロット、ELISA、質量分析法又は免疫組織化学法で測定するとき少なくとも50%上昇しており、

3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性を測定することを更に含んでなり、前記レベルが基礎レベル及び/又は活性と比較して少なくとも50%上昇していることがアルツハイマー病を示す上記インビトロ方法に関する。

【0151】

本発明者らは、ヘパラン硫酸のなかでも、特にタウタンパク質に結合し得るヘパラン硫

酸、3-O-硫酸化-ヘパラン硫酸が高度に上昇しており、よってアルツハイマー病の診断が可能になることを見出した。

アルツハイマー病における前記上昇は、海馬、皮質、CSF及び血液で観察される。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して110%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して120%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して130%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して140%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に参照値と比較して150%以上上昇している。

【0152】

コントロールヒト海馬中の3-O-硫酸化ヘパラン硫酸の基礎レベルは、ジメチルメチレンブルー (DMMB) アッセイで測定するとき、約1 ng/ml 湿潤組織である。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して110%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して120%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して130%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して140%上昇している。

1つの有利な実施形態において、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸のレベル及び/又は活性は更に海馬において基礎レベル及び/又は活性と比較して150%以上上昇している。

【0153】

1つの有利な実施形態において、前記3-O-硫酸化ヘパラン硫酸は、トリ硫酸化GlcA2S/IdoA2S-GlcNS3S及びテトラ硫酸化GlcA2S/IdoA2S-GlcNS3S6S単位形態から選択され、生物学的流体はCSFである。

10

20

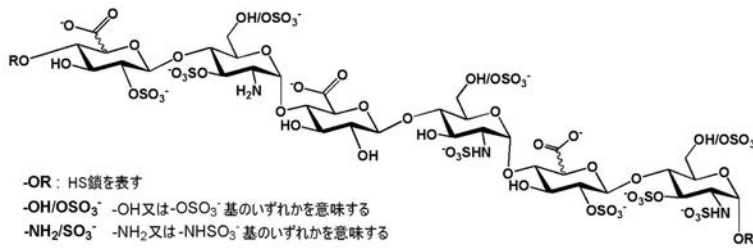
30

40

50

3-O-硫酸化ヘパラン硫酸の代表的構造は以下のとおりである：

【化6】



【0154】

10

1つの有利な実施形態において、本発明は、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質のレベル及び/又は活性を測定することを更に含んでなり、それぞれの参照値と比較して少なくとも10%の上昇がアルツハイマー病を示す、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法の1つに関する。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも40%上昇している。

20

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも90%上昇している。

30

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇しており、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は参照値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇している。

【0155】

ヒトCSF中のpタウの基礎値は約60pg/ml以下であり、総タウについては約450pg/ml以下である。

40

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも40%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活

50

性は基礎値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも100%上昇している。

【0156】

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも10%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも20%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも30%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも40%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも50%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも60%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも70%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも80%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも90%上昇している。

1つの有利な実施形態において、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも100%上昇している。

1つの有利な実施形態において、タウタンパク質の異常リン酸化のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇しており、総タウタンパク質のレベル及び/又は活性は基礎値と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%上昇している。

【0157】

本発明は、3-OST-2酵素がAD患者においてCSF中に存在するという結果を示し、該タンパク質のレベルが同じCSFサンプル中の過リン酸化タウのレベルと相関していることを示す。このことにより、該酵素は、タウタンパク質と同様、細胞外空間に見出すことができ、よってCSFに移動することが証明され、そのレベルの程度又は活性の程度がAD病の診断及び/又は予後予測マーカーとして使用できることが確認される。

【0158】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記生物学的流体がCSFであり、以下：

a) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼ2及び4をそれぞれコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b) 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c) それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物、及び

10

20

30

40

50

d)ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び

e)タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルが対象者においてそれぞれの参照値と比較して上昇している、対象者における神経変性疾患の診断若しくは予後予測若しくは経過観察のため又は対象者が前記神経変性疾患を発症する増大したリスクにあるかどうかを決定するための上記方法の1つに関する。

【0159】

前記遺伝子及び前記遺伝子の前記転写産物及び前記遺伝子の前記翻訳産物及びHSのレベル及び/又は活性は、タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の上昇の前に、上昇し得ることに留意すべきである。

【0160】

別の1つの観点において、本発明は、以下；

a)配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

b)配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

c)それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び/又は

d)前記遺伝子又は前記転写産物又は前記翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型

e)ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖

、

f)異常リン酸化タウタンパク質及び/又は総タウタンパク質

の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を、治療又は予防有効量で対象者に投与することを含んでなる、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する方法に関する。

【0161】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤が、約2000～約20,000ダルトン、好ましくは約20,000ダルトンの分子量を有する多糖又はオリゴ糖、特にヘパラン硫酸模擬体、例えばF6分子、CR36、HM100若しくはHM 2602、又はフコイダン若しくはペントサンポリ硫酸、又は特にペンタサッカリド、例えばArixtra(登録商標)(フォンダバリヌクス)、フコイダン若しくはペントサンポリ硫酸、及び/又は低分子量ヘパリン、例えばエノキサパリン(Lovenox(登録商標))、及び/又は超低分子量ヘパリンである、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤が約20,000ダルトンの分子量を有する多糖又はオリゴ糖、特にヘパラン硫酸模擬体、例えばF6分子であり、前記剤が約1.5mg/Kg～約50mg/Kgの間の用量で静脈内経路により投与される、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

前記剤はまた、別の経路、例えば経口経路により、約50mg/kg～約500mg/kg、特に100～200mg/kgで、又はi.p.などで該経路に適切な投薬量で投与することができる。

【0162】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤がオリゴヌクレオチド、例えば配列番号71で示されるセンスsiRNA及び配列番号72で示されるアンチセンスsiRNA、配列番号73で示されるセンスsiRNA及び配列番号74で示されるアンチセンスsiRNA、配列番号75で示されるセンスsiRNA及び配列番号76で示されるアンチセンスsiRNA、配列番号77で示されるセンスsiRNA及び配列番号78で示されるアンチセンスsiRNAからなるリストから選択されるsiRNA、又はモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

直接又は間接に影響される活性及び/又はレベルが配列番号1及び配列番号3で示される

ヌクレオチド配列からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子の転写産物であり、少なくとも1つの転写産物のレベルが減少しており、特に当初の値のおよそ少なくとも50%である、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

【0163】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤がオリゴヌクレオチド、例えばモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、前記少なくとも1つの遺伝子が配列番号1で示され、前記オリゴヌクレオチドが配列番号5で示される、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤がオリゴヌクレオチド、例えばモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、前記遺伝子が配列番号3で示され、前記オリゴヌクレオチドが配列番号6で示される、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤がオリゴヌクレオチド、例えばモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、前記少なくとも1つの遺伝子が配列番号1及び配列番号3で示される2つの遺伝子から本質的になり、配列番号1で示される遺伝子用オリゴヌクレオチドが配列番号5で示され、配列番号3で示される遺伝子用オリゴヌクレオチドが配列番号6で示される、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

【0164】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤がオリゴヌクレオチド、例えばモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、前記剤が0.1~1mMの間の用量、特に0.5mMで静脈内経路により投与される、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

前記剤はまた、別の経路、例えば経口経路、i.p.経路などにより、当該経路に適切な投薬量で投与することができる。

【0165】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤が多糖、好ましくはペンタサッカリド、例えばArixtra(登録商標)(フォンダパリヌクス)、フコイダン又はペントサンポリ硫酸、及び/又は低分子量ヘパリン、例えばエノキサパリン(Lovenox(登録商標))、及び/又は超低分子量ヘパリンであり、

直接又は間接に影響される活性及び/又はレベルが配列番号2で示される前記遺伝子の翻訳産物である、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

本発明は多糖に限定されず、任意のヘパリンタイプのもを前記剤として使用することができる。

【0166】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤が多糖、好ましくは糖、例えばArixtra(登録商標)(フォンダパリヌクス)、フコイダン又はペントサンポリ硫酸、及び/又は低分子量ヘパリン、例えばエノキサパリン(Lovenox(登録商標))、及び/又は超低分子量ヘパリンであり、前記剤が約1.5mg/Kg~約50mg/Kgの間の用量で静脈内経路により投与される、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

前記剤はまた、別の経路、例えば経口経路により、約50mg/kg~約500mg/kg、特に100~200mg/kgで、又はi.p.で該経路に適切な投薬量で投与することができる。

【0167】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤が小分子、ヘパリン及びヘパラン硫酸作用のインヒビター、例えばプロタミン又は硫酸プロタミンである、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤が小分子であり、前記剤が約1.0mg/Kg~約50mg/Kgの間の用量で静脈内経路により投与される、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

前記剤はまた、別の経路、例えば経口経路により、約50mg/kg~約500mg/kg、特に100~

10

20

30

40

50

200mg/kgで、又はi.pで該経路に適切な投薬量で投与することができる。

【0168】

別の1つの観点において、本発明は、ヘパラン硫酸の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を治療又は予防有効量で対象者に投与することを含んでなる、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する方法に関する。

3-O-硫酸化インヒビター又はヘパラン硫酸スルホトランスフェラーゼインヒビター、特にRazi, Nら(J Biol Chem 1995, 270, 11267-75); Rath, V. L.ら(Drug Discov Today 2004, 9, 1003-11)又はSeko, A.ら(J Inorg Biochem 2009, 103, 1061-6)に記載のものを、この実施形態において使用することができる。

US20100048638に記載されるヘパラン硫酸のインヒビターもまた使用することができる。

10

【0169】

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記少なくとも1つの剤が更にタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質のレベルに直接又は間接に影響する、ヘパラン硫酸の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を治療又は予防有効量で対象者に投与することを含んでなる、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、前記剤が約0.5mg/Kg～約50mg/Kgの間の用量で静脈内経路により投与される、ヘパラン硫酸の活性及び/又はレベルに直接又は間接に影響し、かつタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質のレベルに直接又は間接に影響する少なくとも1つの剤を治療又は予防有効量で対象者に投与することを含んでなる、対象者における神経変性疾患を治療又は予防する上記方法に関する。

20

前記剤はまた、別の経路、例えば経口経路により、約50mg/kg～約500mg/kg、特に100～200mg/kgで、又はi.pなどで該経路に適切な投薬量で投与することができる。

【0170】

別の1つの観点において、本発明は、以下：

a) 神経変性疾患を有する哺乳動物の脳細胞を試験化合物と接触させ、

b)

i. 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は

30

ii. 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は

iii. それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び/又は

iv. 前記遺伝子又は転写若しくは翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は

v. ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び/又は

40

vi. タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルを測定し、

c) 神経変性疾患を有する哺乳動物の、前記化合物に接触させていないコントロールの脳細胞における活性及び/又はレベルを測定し、

d) 接触させた細胞における前記活性及び/又はレベルの差と、非接触の細胞におけるものとを比較することを含んでなり、

接触させた細胞の前記活性及び/又はレベルの変化が、試験化合物が前記疾患のモジュレーターであることを示す、神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)のモジュレーターについてのインビトロスクリーニング方法に関する。

50

【0171】

1つの有利な実施形態では、上記インビトロスクリーニングにおいて、工程b)で測定された活性及び/又はレベルが、以下：

ヘパラン硫酸、又は

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

のものであるとき、ヘパラン硫酸の活性及び/又はレベルとタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルとの両方が測定されるか、又は前記遺伝子、前記遺伝子の前記転写産物、前記遺伝子の前記翻訳産物又は前記遺伝子若しくは前記転写産物若しくは前記翻訳産物の前記フラグメント若しくは誘導体若しくは変異型から選択される少なくとも1つの他の要素の活性及び/又はレベルもまた測定される。

10

【0172】

別の1つの観点において、本発明は、以下：

- a) 神経変性疾患を有する哺乳動物の脳細胞を試験化合物と接触させ、
- b) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の固定化ヘパリンへの結合を測定し、
- c) 神経変性疾患を有する哺乳動物の、前記化合物に接触させていないコントロールの脳細胞における結合を測定し、
- d) 接触させた細胞における前記結合の差と、非接触の細胞におけるものものとを比較することを含んでなり、

接触させた細胞の前記結合の変化が、試験化合物が前記疾患のモジュレーターであることを示す、神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)のモジュレーターについてのインビトロスクリーニング方法に関する。

20

【0173】

別の1つの観点において、本発明は、以下：

- a) 試験化合物を、神経変性疾患の素因を有するか又は該疾患の症状を既に発症している試験動物に投与し、
 - b)
 - i. 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の少なくとも1つ、及び/又は
 - ii. 配列番号1及び配列番号3で示され、ヘパリン-グルコサミン 3-O-スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列からなる群より選択される遺伝子の転写産物の少なくとも1つ、及び/又は
 - iii. それぞれ配列番号2及び4で示される前記遺伝子の翻訳産物の少なくとも1つ、及び/又は
 - iv. 前記遺伝子又は転写若しくは翻訳産物のフラグメント又は誘導体又は変異型、及び/又は
 - v. ヘパラン硫酸、特に3-O-硫酸化ヘパラン硫酸、とりわけ3-O-硫酸化ヘパラン硫酸二糖、及び/又は
 - vi. タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルを前記動物において測定し、
 - c) 神経変性疾患の素因を有するか又は該疾患の症状を既に発症している、前記化合物に接触させていないコントロールの動物において活性及び/又はレベルを測定し、
 - d) 接触させた動物における前記活性及び/又はレベルの差と、非接触の動物におけるものものとを比較することを含んでなり、
- 接触させた動物の前記活性及び/又はレベルの変化が、試験化合物が前記疾患のモジュレーターであることを示す、神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)のモジュレーターについてのインビトロスクリーニング法に関する。

30

40

50

【0174】

1つの有利な実施形態では、上記インビボスクリーニングにおいて、工程b)で測定された活性及び/又はレベルが、以下：

ヘパラン硫酸、又は

タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質

のものであるとき、ヘパラン硫酸の活性及び/又はレベルとタウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の活性及び/又はレベルとの両方が測定されるか、又は前記遺伝子、前記遺伝子の前記転写産物、前記遺伝子の前記翻訳産物又は前記遺伝子若しくは前記転写産物若しくは前記翻訳産物の前記フラグメント若しくは誘導体若しくは変異型から選択される少なくとも1つの他の要素の活性及び/又はレベルもまた測定される。

10

【0175】

別の1つの観点において、本発明は、以下：

a) 試験化合物を、神経変性疾患の素因を有するか又は該疾患の症状を既に発症している試験動物に投与し、

b) タウタンパク質の異常リン酸化及び/又は総タウタンパク質の固定化ヘパリンへの結合を測定し、

c) 神経変性疾患の素因を有するか又は該疾患の症状を既に発症している、前記化合物に接触させていないコントロールの動物において結合を測定し、

d) 接触させた動物における前記結合の差と、非接触の動物におけるものとを比較することを含んでなり、

20

接触させた動物の前記活性及び/又はレベルの変化が、試験化合物が前記疾患のモジュレーターであることを示す、神経変性疾患、有利にはタウオパチー、特にアルツハイマー病(但し、前記神経変性疾患はプリオン病とは異なる)のモジュレーターについてのインビボスクリーニング法に関する。

【0176】

1つの好適な実施形態において、本発明は、前記動物がマウス、例えばSAMP8マウス及び/又はADの3xTg-ADマウスモデルである、神経変性疾患、特にアルツハイマー病のモジュレーターについての上記インビボスクリーニング法に関する。

1つの好適な実施形態において、本発明は、前記動物がゼブラフィッシュである、神経変性疾患、特にアルツハイマー病のモジュレーターについての上記インビボスクリーニング法に関する。

30

【0177】

図面の説明

図1は、ヘパラン硫酸(HS)のアセンブリ及び既知のリガンド(FGF、FGFR及びアンチトロンピンを含む)の結合部位を示す。グルコサミン残基の3-O-位の硫酸化は、ヘパラン硫酸(グルコサミン) 3-O-スルホトランスフェラーゼのファミリー-HS 3-O-スルホトランスフェラーゼ-1~6(HS3ST1~6)により触媒される。この3-O-硫酸化はヘパラン硫酸生合成における最後の代謝的修飾であり(Bishopら, 2007, Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. Nature 446:1030-1037)、ヘパラン硫酸の栄養機能に関連せず、組織発現は非常に低い(総HSの約0.2%)ので、ほとんどが、これら糖のマイナーな硫酸化形態である。

40

【0178】

図2A~2Cは、AD死後脳の海馬における総硫酸化GAGレベル(2A)及び特に総HSスルフェートレベル(2B)が年齢適合正常コントロール脳のGAG及びHSと比較して上昇していることを示す(個体及び脳の特徴を表Iに記載する)。DMMBアッセイ(Huynhら, neurobiology of aging 2010)を使用して、GAG及びHSレベルを死後脳サンプルで検出、定量した。

図2A: 総GAG($\mu\text{g}/\text{mg}$ 組織)。白ヒストグラム: コントロール。黒ヒストグラム: AD患者。

図2B: 総HS($\mu\text{g}/\text{mg}$ 組織)。白ヒストグラム: コントロール。黒ヒストグラム: AD患者。

図2C: 左上(a): コントロール脳; 右上(b): AD脳における斑(plaque)及びもつれ(tangle)。左下(c): AD脳における斑; 右下(d): AD脳におけるもつれ。

50

【 0 1 7 9 】

表 1 . 脳組織を提供した対象者の特徴

【 表 1 】

性別	年齢 (歳)	PMD ^a (h)	群	死亡の直接原因 ^b	老人斑 ^c /mm ²	CERAD/ Braak and Braak ^d	
M	62	20.2	コントロール	心筋梗塞	32	I	10
M	65	8.2	コントロール	外傷性血胸	47	0	
M	65	8.6	コントロール	射殺	51	I	
F	73	15.3	コントロール	気管支肺炎	65	II	
M	61	9.3	コントロール	肺動脈血栓症	36	0	
F	64	14.3	コントロール	外傷性肝臓破裂	41	I	
M	60	21.0	コントロール	気管支肺炎	44	0	
F	76	24.0	コントロール	心筋梗塞	65	I	
平均	67.8	15.1					
± SD	±2.9	± 2.2					
M	84	19.0	AD	気管支肺炎	78	IV	20
F	70	10.3	AD	気管支肺炎	65	III	
F	98	14.2	AD	気管支肺炎	87	III	
M	84	14.0	AD	大動脈破裂	84	IV	
F	82	9.2	AD	胸部外傷	87	III	
F	75	19.2	AD	肺動脈血栓症	80	IV	
F	69	5.4	AD	心筋梗塞	76	IV	
M	82	21.2	AD	心筋梗塞	80	III	
平均	76.8	14.1					
± SD	±3.5	± 2.0					

30

^a PMD: 死亡後遅延。2群間にPMDに統計学的有意差なし ($p=0.7249$)

^b 射殺されて死亡した対象者は外傷性脳病変を有していない

^c 老人斑及びNFT値は各観察領域について6視野の計数から算出した相加平均(平均±SEM)を表す

^d CERAD スコア(A, B又はC)/Braak and Braak ステージ(I~IV)

30

【 0 1 8 0 】

図 3 は、HS生合成に関与するスルホトランスフェラーゼ及び幾つかの他の酵素の転写物レベルを示す。

NS: 酵素発現に有意な変化なし

ND: 当該酵素の検出なし

【 0 1 8 1 】

図4A~4Hは、AD対象者及び年齢適合コントロールの海馬におけるHS及び過リン酸化タウの共存を示す。

アルツハイマー病(AD)及び年齢適合のヒト海馬凍結切片を抗HS抗体(10E4)(図4A及びB)及び抗タウ262抗体(図4C及びD)とインキュベートし、続いてフルオロプローブAlexa 568及びAlexa 488を付した二次抗体で標識した。

切片をDAPIで標識した(図4E及びF)。右パネルは重ね合わせである(図4G及びH)。スケールバー=50 µm。

40

50

【 0 1 8 2 】

図5は、AD患者の脳脊髄液(CSF)中の3-OST-2(HS3ST2)タンパク質レベルを、同一サンプル中のリン酸化タウタンパク質(pタウ、Ser231エピトープ)レベルと比較して示す。ウェスタンブロットを使用して、サンプル中のタンパク質レベルを検出し比較した。

【 0 1 8 3 】

図6A及び6Bは、年齢適合正常コントロール脳のGAGより高い、AD海馬抽出GAGのヒトタウタンパク質結合能を示す。ELISA試験を使用して、種々のGAGのタウタンパク質結合能を比較した。ELISA競合アッセイを使用して、競合GAGの不在下で固定化ヘパリンにタウを結合させた。アッセイには、GAG(0.1~1000ng/mLを使用)をタウタンパク質(100ng/mLで使用)と共にELISAに加えた。4にて1時間のインキュベーション後、プレートを洗浄し、プレート中に残存するタウシグナルを記録した。X軸：総硫酸化GAGへのタウタンパク質の結合%。EC50は、固定化ヘパリンへのタウタンパク質結合の50%を阻害するに必要なGAG濃度を表す。Y軸：コントロール(白ヒストグラム)、AD(黒ヒストグラム)。

10

【 0 1 8 4 】

図6A ELISA型競合アッセイで測定したとき、コントロールGAGが示すタウタンパク質へのGAG結合を100%効果と見なした。

X軸：総硫酸化GAGへのタウタンパク質結合%

Y軸：コントロール(白ヒストグラム)、AD(黒ヒストグラム)

図6B ELISA型競合アッセイで測定した総GAGのタウへの結合能の変化。固定化ヘパリンへの当該因子の結合の50%を阻害するに必要なGAG濃度を表す。

20

【 0 1 8 5 】

図7A及び7Bは、インビトロでのタウ異常リン酸化に対するGAG及びヘパリンの効果を示す。

図7Aは、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3(GSK-3)による組換えヒトタウタンパク質(ヒトタウの441アミノ酸イソフォーム)の病的異常リン酸化を誘導する、AD海馬抽出GAG(GAG-AD)の効果が年齢適合脳GAG(GAG-CT)の効果と比較して上昇していることを示す。タウ396抗体を使用して、異常リン酸化タウの形成を検出した。

x軸：時間(h)

y軸：pmol Pタウ/mol タウ

黒三角：ヘパリン、黒丸：GAG-AD、白丸：GAG-CT、白三角：コントロール。

30

【 0 1 8 6 】

図7Bは、GSK-3キナーゼによる組換えヒトタウタンパク質の病的異常リン酸化を誘導する、ヘパリン、3-O-硫酸化を含むヘパリンオリゴ糖(Arixtra)及び3-O-硫酸化を欠くヘパリンオリゴ糖の効果を示す。タウ396抗体を使用して、異常リン酸化タウの形成を検出した。

x軸：時間(h)

y軸：pmol Pタウ/mol タウ

黒三角：ヘパリン、黒菱形：Arixtra(3硫酸化)、白菱形：ヘキサヘパリン(非3硫酸化)、白三角：コントロール。

40

【 0 1 8 7 】

図8A~8Gは、SH-SY5Y分化細胞の2つのモデルにおける異常リン酸化に対するGAG(ヘパリン硫酸を含む)硫酸化阻害の効果を示す。

図8Aは、野生型分化SH-SY5Y細胞におけるGAG硫酸化阻害の効果を示す。硫酸化は、クロラート(50mM)(3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホスルフェート生合成のインヒビター)を用いて阻害する。クロラート処理後に減少した異常リン酸化タウエピトープS199、T231、S262及びS396レベルをウェスタンブロット分析で確認した。

x軸：タウエピトープ：左から右へ、抗タウ199、抗タウ231、抗タウ262又は抗タウ396リン酸化エピトープ

y軸：pタウ/アクチン

【 0 1 8 8 】

50

図8Bは、ウェスタンブロット分析で明らかにされた、クロラート処理有り/無しでの、異常リン酸化タウエピトープS199、T231、S262及びS396レベルに対するH₂O₂(500mM)の効果(0~24時間)を示す。

図8Cは、フローサイトメトリ分析で明らかにされた、野生型細胞での、異常リン酸化タウエピトープS199及びS396レベルに対するクロラート処理(75mM)の効果を示す。

x軸：タウエピトープ：左から右へ、抗タウ199リン酸化エピトープ(クロラートなし及びあり)又は抗タウ396リン酸化エピトープ(クロラートなし及びあり)

y軸：pタウ/総タウ

【0189】

図8Dは、フローサイトメトリ分析で明らかにされた、野生型H₂O₂(500mM)ストレス負荷細胞での、異常リン酸化タウエピトープS199及びS396レベルに対するクロラート(75mM)処理の効果を示す。

x軸：タウエピトープ：左から右へ、抗タウ199リン酸化エピトープ(クロラートなし及びあり)又は抗タウ396リン酸化エピトープ(クロラートなし及びあり)

y軸：pタウ/総タウ

【0190】

図8Eは、フローサイトメトリ分析で明らかにされた、hTauP301L SH-SY5Y細胞での、異常リン酸化タウエピトープS199及びS396レベルに対するクロラート(75mM)処理の効果を示す。hTauP301L SH-SY5Y細胞は、ヒトタウ(hTau)で恒久的にトランスフェクトされ、変異P301Lが導入されている細胞である。

x軸：タウエピトープ：左から右へ、抗タウ199リン酸化エピトープ(クロラートなし及びあり)又は抗タウ396リン酸化エピトープ(クロラートなし及びあり)

y軸：pタウ/総タウ

【0191】

図8Fは、タウの異常リン酸化(エピトープS396)に対する、SH-SY5Y細胞へのhTauP301L変異導入の効果を示す。

図8Gは、タウの異常リン酸化(エピトープS396)に対する、hTauP301L SH-SY5Y細胞における3-OST-2サイレンシング(センス用には配列番号73で示されるsiRNA、アンチセンス用には配列番号74で示されるsiRNA)の効果を示す。Ctrl：コントロールのhTauP301L SH-SY5Y細胞；Lipo：リポフェクタミン処理細胞(ネガティブsiRNAコントロール)、10、20、40及び80nMのHS3ST2 siRNA。

【0192】

図9は、タウ-P301Lを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュモデルの技術的利点を示す。

駆動構築物は、応答構築物のUASに結合するGal4-VP16の発現を駆動する神経細胞ゼブラフィッシュプロモーターHuCを含有する。これは、最小プロモーターを介してhTAU-P301L及びロダミン(DsRed)の二指向性発現を活性化する。タウ及びDsRedのUAS依存性遺伝子発現は、生存サカナにおいて、DsRed蛍光で示される。駆動構築物及び応答構築物は、To12トランスポゾン部位に挟まれている(図2)(Paquetら, 2009)。

【0193】

図10A及び10Bは、hTAU-P301Lトランスジェニックゼブラフィッシュにおけるタウのリン酸化を示す。

図10A：5日齢ゼブラフィッシュ胚の脳(野生型(a)対hTAU-P301Lトランスジェニックモデル(b))を解剖して抗タウAT180抗体で標識した。標識された過リン酸化部位(緑色)が、トランスジェニックモデルにおいて、終脳(Tel)、小脳(Cer)及び脊髄上部領域(SC)に位置する(略号：A：前側、P：後側、TeO：視蓋、Cer：小脳)。

【0194】

図10B：トランスジェニックhTAU-P301Lにおける(リン酸化タウタンパク質レベル)/(総タンパク質レベル)と野生型非トランスジェニック同腹体との比較。過リン酸化タウタンパク質蓄積は、トランスジェニックhTAU-P301Lにおいて、非トランスジェニック同腹体と

10

20

30

40

50

比較して90倍増大していることが証明される。

X軸：リン酸化タウ/総タンパク質。

Y軸：左ヒストグラム：野生型タンパク質、右ヒストグラム：変異タウ。

【0195】

図11は、トランスジェニックhTAU-P301Lゼブラフィッシュにおける3-OST-2及び-4の発現を示す。

3-OST-2及び3-OST-4の相対量は、トランスジェニックhTAU-P301Lサカナ(「DsRed」と示す)対WTでリアルタイムPCRにより検出した。WTによる酵素発現を100%とした。

X軸：相対量のパーセンテージ

Y軸：左から右へ：

左側の白及び黒ヒストグラム(3-OST-2)：白：WT；黒：DsRed

右側の白及び黒ヒストグラム(3-OST-4)：白：WT；黒：DsRed

10

【0196】

図12A及び12Bは、注入24時間後の3-OST-2モルファントの生存率及びリン酸化タンパク質レベルの減少を示す。

図12A：生存率は、0.5mMのモルホリン濃度を用いた3-OST-2モルファントで測定した。24hpf(受精後時間)後のトランスジェニックhTAU-P301Lゼブラフィッシュ胚において、3-OST-2をコードする遺伝子のモルホリン-媒介ノックダウンを、コントロールとして用いた非注入胚と比較した。

X軸：注入の%

Y軸：左ヒストグラム：致死率、右ヒストグラム：生存率

図12B：モルファント胚におけるリン酸化タウタンパク質レベル/(総タンパク質レベル)と非注入コントロールとの比較(n=98のプール、3つの異なる注射シリーズ)。

X軸：(リン酸化タウ)/(µg/ml 総タンパク質)。Y軸：MO 3-OST-2

20

【0197】

図13A~13Fは、抗PHF-タウ抗体クローンAT8で検出した異常リン酸化タウタンパク質の脊髄内蓄積を減少させる、ゼブラフィッシュモデル(Paquetら 2009)における3-OST-2のモルホリン阻害を示す。

図13A、13C及び13E：変異タウタンパク質P301L発現ゼブラフィッシュ脊髄の免疫染色(図13A：タウタンパク質(DsRed)、図13C：抗PHF-タウ抗体クローンAT8で検出した過リン酸化タウタンパク質、13E：13A及び13Cを1つにした図)

図13B、13D及び13F：3-OST-2タンパク質が阻害されている変異タウタンパク質P301L発現ゼブラフィッシュ(モルファント)脊髄の免疫染色(図13B：変異の存在を示すDsRed、図13D：抗PHF-タウ抗体クローンAT8で検出した過リン酸化タウタンパク質、図13F：13B及び13Dを1つにした図)。

30

【0198】

図14A~14Fは、異常リン酸化タウタンパク質のゼブラフィッシュ脳内蓄積を減少させる、ゼブラフィッシュモデル(Paquetら 2009)における3-OST-2の阻害を示す。

図14A、14C及び14E：非注入コントロールに相当する、変異タウタンパク質P301L発現ゼブラフィッシュ脳の免疫染色(図14A：DsRed、図14C：抗PHF-タウ抗体クローンAT8で検出した過リン酸化タウタンパク質、14E：14A及び14Cを1つにした図)。

図14B、14D及び14F：3-OST-2タンパク質が阻害されている変異タウタンパク質P301L発現ゼブラフィッシュ(モルファント)脳の免疫染色(図14B：DsRed、図14D：抗PHF-タウ抗体クローンAT8で検出した過リン酸化タウタンパク質、14F：14B及び14Dを1つにした図)。

40

【0199】

図15A~15Fは、タウタンパク質の異常リン酸化及び変異効果からの軸索回復に対する3-OST-2発現阻害の効果を示す。

図15A、15C及び15E：非注入コントロールに相当する、変異タウタンパク質P301L発現ゼブラフィッシュ軸索の免疫染色(図15A：DsRed、図15C：抗pタウ231で検出した過リン酸化タウタンパク質、15E：15A及び15Cを1つにした図)。(10×、スケールバー=50mm)。

50

図15B、15D及び15F：3-OST-2タンパク質が阻害されている変異タウタンパク質P301L発現ゼブラフィッシュ(モルファント)軸索の免疫染色(図15B：変異を示すDsRed、図15D：過リン酸化タウタンパク質、15F：15B及び15Dを1つにした図)。

3OST-2スプライスマルファントではDsRed/hTauP301Lよりpタウ231染色が低く、矢印は軸索異常が反転していることを示す(10×、スケールバー=50mm)。

【0200】

図16A~16Fは、タウタンパク質の異常リン酸化及び変異効果からの軸索回復に対する3-OST-2発現阻害の効果を示す。

図16A、16C及び16E：非注入コントロールに相当する、変異タウタンパク質P301L発現ゼブラフィッシュ軸索の免疫染色(図16A：DsRed、図16C：抗pタウ231で検出した過リン酸化タウタンパク質、16E：16A及び16Cを1つにした図)。(20×、スケールバー=20mm)。

図16B、16D及び16F：3-OST-2タンパク質が阻害されている変異タウタンパク質P301L発現ゼブラフィッシュ(モルファント)軸索の免疫染色(図16B：タウタンパク質(DsRed)、図16D：抗pタウ231で検出した過リン酸化タウタンパク質、16F：16B及び16Dを1つにした図)。

3OST-2スプライスマルファントではDsRed/hTauP301LよりP-タウ231染色が低く、軸索異常は明らかである(20×、スケールバー=20mm(第1列)、50mm(第2列))。

【0201】

図17A及び17Bは、ADの老化促進モデル(SAMP8マウス)におけるHS模擬体F6の効果を示す。SAMR1マウスをコントロールとして使用した(コントロール)。F6は、腹腔内(i.p.)で25若しくは50mg/kg又は経口で100若しくは200mg/kgの高用量(H)及び低用量(L)で使用した；週2回を2週間。処置は、マウスが5ヶ月齢時に始め、マウスが7ヶ月齢のとき終了した。ヒペルジンA(Hyperzine A)はポジティブコントロール薬剤として使用した。

図17A：空間学習能力(n=10)。プラットフォームへの到達に成功したマウス%
ヒストグラム 左から右へ：コントロールモデル(SAMP8)、フペルジンA、F6：腹腔内50mg/kg、F6：腹腔内25mg/kg、F6：経口200mg/kg、F6：経口100mg/kg。

図17B：空間記憶能力(n=10)。7週齢(2ヶ月処置)時の四分円プラットフォームの探索時間。

ヒストグラム 左から右へ：コントロールモデル(SAMP8)、フペルジンA、F6：腹腔内50mg/kg、F6：腹腔内25mg/kg、F6：経口200mg/kg、F6：経口100mg/kg。

F6は、2ヶ月処置後(7ヶ月齢時)にモリス水迷路において空間記憶保持を増大させた。

【0202】

図18は、病的リン酸化タンパク質(pタウ199/202)の特異抗体を用いて行った脳(皮質)のウェスタンブロット分析(WB)で示された、ヘパラン硫酸F6を腹腔内用量25若しくは50mg/Kg又は経口用量100若しくは200mg/kgで処置したSAMP8の脳内での過リン酸化タウタンパク質(病的pタウ199/202)の減少を示す。この研究は2ヶ月処置後に(7ヶ月齢マウスで)行った。

上のWB：タウ199、及び下のWB：GADPH

左から右へ：コントロールモデル(SAMP8)、フペルジン(抗アルツハイマーコントロール)、2ヶ月間(5ヶ月齢から7ヶ月齢までの間、週2回)、F6 25mg/kgを腹腔内処置したSAMP、F6 50mg/kgを腹腔内処置したSAMP、F6 100mg/kgを経口処置したSAMP、F6 200mg/kgを経口処置したSAMP。

モデルにおける矢印は、コントロールと比較して上昇した過リン酸化タウタンパク質を示す。

F6処理群(50mg/kg)における矢印は、モデルと比較して減少した過リン酸化タウタンパク質を示す。

【0203】

図19A~19Iは、SAMR1マウス(7ヶ月齢)及びヘパラン硫酸模擬体F6を腹腔内用量25mg/Kgで処置した又はしなかったSAMP8マウス(7ヶ月齢)(3マウス)の遊泳図(モリス水迷路)を示す。

10

20

30

40

50

図19A、19D及び19G：コントロールSAMR1マウス(コントロール)。

図19B、19E、19H：モデルSAMP8マウス。

図19C、19F、19I：F6処置したモデルSAMP8マウス。

処置動物は、有意な記憶増大を示す。

【0204】

図20は、ヒトタウタンパク質に対するヘパリン/グリコサミノグリカン競合アッセイを示す。

x 軸：左から右へ：ヘパリン、コンドロイチン硫酸 A (CSA)、コンドロイチン硫酸 C (CSC)、HS、フコイダン、F6。

y 軸：hタウに対する試験化合物の結合のパーセンテージ

フコイダン及びF6は、ヒトタウタンパク質への結合についてヘパリンと競合し得る。

【0205】

図21は、F6、CR36、HM2602及びデキストランの血液脳関門(BBB)透過性研究を示す。

x 軸：時間(分)

y 軸：経膜通過のパーセンテージ

四角：HM-オリゴ糖F6

三角(上向き)：HM-オリゴ糖CR36

菱形：HM2602

三角(下向き)：オリゴ-デキストラン

【0206】

図22は、ウェスタンブロットゲルのデンシトメトリー分析で測定したCSF中のpタウ231及びHS3ST2レベルを、DMMB法で測定したCSF中のHS硫酸レベルと相関させて示す。

全ての患者が、臨床的及び生化学的評価でADと診断された。程度に応じて「+」、「++」、「+++」で示した。ADの程度は、WBのデンシトメトリー分析で測定したCSF中のpタウ231レベルにより推定した。

各々3サンプルを分析した。

x 軸：左から右へ：AD+、AD++及びAD+++。

ADの各程度について、左から右へのヒストグラム：pタウ231、HS3ST2、HS。

左 y 軸：光学密度/タンパク質濃度(任意単位)

右 y 軸：総HS量(µg/mL)

この図は、OST-2、HS及びリン酸化タウの濃度が、ADの程度の増大(AD+からAD+++まで)につれて、有意に上昇することを示す。

【0207】

図23は、AD患者(図5と同一患者)由来CSFの存在下(0.5ug/ウェル)での固定化ヘパリンへのタウ結合のパーセンテージを示す。HSはCSFから抽出し、DMMB法で定量し、この競合アッセイに使用した。ELISAプレート中で、固定化ヘパリンへのタウタンパク質結合はCSF由来HSで阻害される。

このELISAアッセイに使用した総タウは市販のものであった。

これら結果は、最高量のpタウを含有するCSFは、固定化ヘパリンへのタウ結合を阻害する最も高い能力を有するHSも含むことを示す。

各CSFサンプルを、結合試験で3回アッセイした。

このことは、タウオパチーとCSF HSが総タウに結合する能力との間の相関を示す。

【0208】

図24A~24Hは、0.1及び10 µg/mLのF6分子を用いた細胞(SH-SY5Y分化細胞)間のタウ凝集体転移阻害モデルを示す。ドナー細胞におけるタウ-EYFPの発現に使用した構築物は、以前に報告されたとおりである：J Biol Chem. 2009 May 8;284(19):12845-52. Epub 2009 Mar 11. Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. Frost B, Jacks RL, Diamond MI。

図24A~24Eはこの研究に使用した一般的なプロトコルを示す。

【0209】

10

20

30

40

50

図24A :

凝集体ドナー細胞 : SH-SY5Y細胞を、Frost B, Jacks RL, Diamond MI. J Biol Chem. 2009 May 8;284(19):12845-52. Transfected cells produce green Tau aggregatesに従って、タウ-EYFPでトランスフェクトする。

レシピエント細胞 : 野生型SH-SY5Y細胞

図24B : トランスフェクト細胞をトランスウェルの上部チャンバ中で培養した。非トランスフェクト細胞をトランスウェルの底部チャンバ中で培養した。凝集体ドナー細胞(タウ-EYFPトランスフェクト細胞)及びレシピエント細胞(非トランスフェクト細胞)の両方を、 $10\ \mu\text{M}$ のレチノール酸の存在下で7日間培養して分化させる。

【0210】

図24C : 凝集体ドナー細胞(トランスフェクト細胞)及びレシピエント細胞(非トランスフェクト細胞)の両方に酸化ストレスパルス(H_2O_2 、 $500\ \mu\text{M}$)を30分間供する。この後、ストレス因子含有培地を、F6分子を含有するか又は含有しない新鮮培地と交換した。

図24D : 凝集体ドナー細胞及びレシピエント細胞を24時間共培養する。

図24E : レシピエント細胞を固定し、bIII-チューブリン(赤)で標識し、顕微鏡で検査する。

細胞を固定し、標識した。A)薬剤処理しなかったストレス負荷細胞。B)F6($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$)で処理したストレス負荷細胞。C)各条件について、3つの異なる培養物において10の異なる視野でタウ凝集体を計数した。

【0211】

図24F : F6で処理せず且つストレス負荷SH-SY5Y/タウ-EYFPと共インキュベート(共培養)したストレス負荷レシピエントSH-SY5Y細胞は、ストレス負荷ドナー細胞由来の緑色タウ凝集体に感染していることが示される(白色矢印)。

図24G : F6分子($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$)で処理され且つストレス負荷SH-SY5Y/タウ-EYFPと共インキュベートしたストレス負荷レシピエントSH-SY5Y細胞。各条件について、3つの異なる培養物において10の異なる視野でタウ凝集体(白色矢印)を計数した。

図24H : 処置に応じた視野あたりの蛍光タウ凝集体数。

x軸 : 左から右へ : 非ストレス負荷、ストレス負荷、ストレス負荷 + F6($0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$)、及びストレス負荷 + F6($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$)。

y軸 : 視野あたりの蛍光タウ凝集体数

F6分子は、蛍光タウ凝集体数を顕著に減少させる。

【0212】

図24A~24Hは、F6分子が細胞(SH-SY5Y分化細胞)間のタウ凝集体転移を阻害し、よって多糖(例えば、ヘパラン硫酸模擬体、特にF6分子)がタウオパチー、特にアルツハイマー病を治療し得ることを示す。

【0213】

図25は、レチノール酸で分化させ且つペプチドA₂₅₋₃₅($25\ \mu\text{M}$)で処理したSH-SY5Y細胞におけるヘパラン硫酸模擬体F6の保護効果を示す。

x軸 : 左から右へ : Aなしコントロール、Aありコントロール、A + F6($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$)、A + F6($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$) ;

y軸 : MTT検査で測定した生存細胞の%

p値 < 0.05を統計学的に有意とみなした。

注記 : * 0.05、** 0.01、*** 0.001

【0214】

図26は、ペプチドA₄₂で処理したSH-SY5Y分化細胞に対する種々のヘパラン硫酸模擬体の効果を示す。

x軸 : 左から右へ : Aなしコントロール、Aありコントロール、A + E5($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$) ; A + F6($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$) ; A + D6($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$) ;

y軸 : MTT検査で測定した生存細胞の%

カラムをコントロール + A と比較する : p値 < 0.05を統計学的に有意とみなした。

10

20

30

40

50

注記：* 0.05、** 0.01、*** 0.001

【0215】

図27は、A 25-35での6時間又は24時間処理後の細胞タンパク質抽出物中のタウリン酸化を示す。AT 180で検出したヘパラン硫酸模擬体D6及びF6(10 µg/mL)の効果。

ヘパラン硫酸模擬体はリン酸化タウを減少させる。

【0216】

図28A~28Cは、10 µg/mLのヘパラン硫酸模擬体Dx、D4、D5、D6、F6で処理したA 42ストレス負荷細胞におけるタウリン酸化を示す。

図28A：pタウ396

図28B：アクチン

図28C：種々の化合物に応じたpタウ396/アクチン

x軸：左から右へ：コントロール、A 12時間、A 24時間、デキストラン、D4、D6、E5、F6。

y軸：pタウ396/ -アクチン(コントロールの%)

統計計算は、2つのWBからの平均シグナルを用いて行う。

ヘパラン硫酸模擬体はリン酸化タウを減少させる。

10

【0217】

図29は、10 µg/mLのヘパラン硫酸模擬体D4、E5及びF6で24時間処理したA 42ストレス負荷細胞におけるタウリン酸化を示す。

ヘパラン硫酸模擬体、例えばD4、E5及びF6は、リン酸化タウを減少させる。

20

【実施例】

【0218】

実施例

実施例1 . コントロール及びADヒト脳組織からの脳組織切出し：

死後ヒト脳サンプル採取を、AD登記作成協議会(Consortium to Establish a Registry of AD : CERAD)に従って行った。本研究には2つの実験群が含まれた：60~77歳(平均年齢 67.8 ± 2.9 歳)の老齢群(n = 8、コントロール群)及び69~82歳(平均年齢 76.8 ± 3.5 歳)のAD群(n = 8)。本研究に参加した対象者は、有資格者の神経病理学者による死後評価を受けた。死後間隔は、両群について、8.0時間から15.2時間まで異なった。2群間に死後遅延について統計学的に有意な差はなかった(p = 0.1781)。剖検時に脳を得て、剖検後2時間以内に矢状方向に半分にした。一方の半球を、前頭面に沿って2 cm厚の切片に切り分けて、海馬(側頭葉)、皮質及び小脳を切り出した。切出し直後に組織をドライアイスで凍結させた。組織サンプルを使用時まで - 80 で保存した。

30

【0219】

実施例2 . コントロール及びADヒト脳組織内の老人斑及び神経原線維もつれ(NFT)の定量：

脳内の神経病理学的変化を、アルツハイマー病登記作成協議会(CERAD)及びBraak and Braakのガイドラインを用いて調べた。老人斑及びNFTは、ビールショースキー(Bielschowsky) - 中前頭回、中側頭回、下頭頂小葉、後頭極、海馬CA1及び嗅内皮質(enthorinal cortex)の染色切片 - に基づいて決定した。老人斑は10x対物レンズを用いて計数し、NFTは20x対物レンズを用いて計数した。相加平均は、各領域について6視野のカウント(老人斑/mm²及びNFT/mm²)から算出した(平均 ± SEM)。次いで、CERADが提唱するガイドライン及びBraak and Braakの基準を用いて神経病理学的診断を行った。AD脳は、海馬分析からステージIII~Vであると特徴付けられた。コントロール脳は非ADであると判定された。

40

【0220】

実施例3 . ヒト海馬における免疫組織化学的HS及びタウ共存

アルツハイマー及び年齢適合コントロールのヒト海馬切片(20 µm)を3%酢酸で室温(rt)にて10分間固定した。次いで、切片をリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中3%のBSAと30分間インキュベートし、PBS中0.2%のTriton X100で30分間透過化した。HSを、透過化緩衝液(1:200)に溶解した抗ヘパラン硫酸(10E4エピトープ, Seikagaku corp., AMS Biotechno

50

logy販売)及び抗タウホスホセリン262(Millipore)とrtにて1時間30分間インキュベートして染色した。Alexa 568蛍光プローブ(Molecular Probes)及びAlexa 488蛍光プローブ(Interchim)に接合した二次抗体で組織スライドを染色することにより、蛍光を導入した。次いで、切片を1 µg/mL DAPI溶液で3分間DAPI標識し、エタノールでリンスした。画像は、先ず、BH-2エビ蛍光光学顕微鏡(Olympus)に取り付けたCCDモノクロカメラ(CFW-1310M, Scion Corporation, USA)を用いて撮影した。Scion VisiCapture 2.0ソフトウェアを用いて画像を収集した。画像処理は、ImageJソフトウェア(W. Rasband, National Institute of Mental Health, Maryland, USA)を用いて行なった。核のDAPI標識は、以前に記載されたとおりに定量した(Blondetら, 2006)。

【0221】

実施例4 . アルツハイマー病海馬における3-OST酵素の発現

本実施例では、HS生合成に關与する3-OST酵素の発現が、アルツハイマー病海馬サンプルでコントロール海馬サンプルと比較して変化しているかどうかを調べた(表2)。結果は、アルツハイマー病海馬における3-OST-2及び3-OST-4の過剰発現を示す。このことにより、脳のHS鎖における3-O-硫酸化の増大及び3-OST-2転写物は発現増強がアルツハイマー病に特徴的であると考えられ得ることが示唆される。コントロール実験として、(アルツハイマー病脳で増強していることが知られている(Burbaevaら, 2005))グルタミンシンセターゼ(GS)及びグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH)が予想どおり発現されており、(アルツハイマー病で年齢適合個体群と比較して安定に維持されていると報告されている(Cartierら, 2005))ケモカインレセプター4の発現が不変であることも確証した。遺伝子発現の予想された増大と一致する我々の結果(表2)は、RIN数により示されるように、生物学的材料の質がこれら研究と一致するものであったことを示している。

【0222】

【表2】

表2. リアルタイムPCRによるヒト3-OST酵素発現

標的	酵素	相対量 コントロール(µg/mL)	相対量 アルツハイマー病 (µg/mL)	発現 アルツハイマー病 対 コントロール
ヘパラン硫酸	3-OST-1	0.75 ± 0.09	0.96 ± 0.20	NS
	3-OST-2	0.37 ± 0.07	2.06 ± 0.46	↑**
	3-OST-3a	0.35 ± 0.08	2.17 ± 0.86	↑*
	3-OST-3b	0.58 ± 0.21	1.76 ± 0.43	↑*
	3-OST-4	1.33 ± 0.12	5.04 ± 0.31	↑***
	3-OST-5	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.02	NS
	3-OST-6	-	-	ND

NS:酵素発現に有意な変化なし
ND:酵素の検出なし

【0223】

コントロール及びADヒト脳組織からのRNA抽出及びRTqPCR:

総RNAをヒト海馬から抽出した。定量的PCR(qPCR)用のプライマー(Eurofins, Germany)はPrimer3outputが設計した。qPCRは、鋳型cDNAからLightCycler FastSart DNA Master S YBR Greenキットの製造業者(Roche, Germany)の指示に従って行った。qPCR条件は、プライマーセットに依存した(表3)。サンプルは1回で同時に増幅させた。遺伝子発現の相対的定量は、CT法(Schefeら, 2006)とも呼ばれる比較CT法を用いて行った。2つの参照遺伝子(-チューブリン及びTFIID)を内因性コントロールとして使用した。これら遺伝子の標準化はGenormプログラム(Vandesompeleら, 2002)で達成した。

【0224】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表3. ヒト海馬におけるリアルタイムqPCR用オリゴヌクレオチド

遺伝子名	アクセッション番号	オリゴヌクレオチド配列 (センス)	オリゴヌクレオチド配列 (アンチセンス)
NDST-1	NM_001543	GGAAGTGTGTCCGTGGTTC (配列番号 :11)	CCCTGGTAACTGTGCTCCAT (配列番号 :12)
NDST-2	NM_003635.3	CTCCAGTTGTGGAAGGTGGT (配列番号 :13)	CTTAGGGCTGGTGGACACAT (配列番号 :14)
NDST-3	NM_004784	CGACCTCCAACACCTACCAT (配列番号 :15)	TAGGACTGTGGGGTCTGTCC (配列番号 :16)
NDST-4	NM_022569	GCAACGGTGATTCAGGATCT (配列番号 :17)	TGTGCAGCCAAAAGTTCAAG (配列番号 :18)
GLCE	NM_015554	GGAAGTGTGTCCGTGGTTCT (配列番号 :19)	CCCTGGTAACTGTGCTCCAT (配列番号 :20)
HS2STVar1	NM_012262	CGAAGTCCGAGAAATTGAGC (配列番号 :21)	AATGAAGTGCTTGCCGTTTT (配列番号 :22)
HS2STVar2	NM_0011344 92	CGAAGTCCGAGAAATTGAGC (配列番号 :23)	AATGAAGTGCTTGCCGTTTT (配列番号 :24)
HS6ST1	NM_004807	GGCCCTTCATGCAGTACAAT (配列番号 :25)	TACAGCTGCATGTCCAGGTC (配列番号 :26)

10

20

【表 3 - 2】

HS6ST2VarL	NM_0010771 88	CGGGGTTCTCCAAACACTAA (配列番号 :27)	GTCTCGGAGGATGGTGATGT (配列番号 :28)	
HS6ST2VarS	NM_147175	AGGCTCCTTCAGACCCATTT (配列番号 :29)	TCGGATTTGGGTTCTGACTC (配列番号 :30)	
HS6ST3	NM_153456	CATCTCCCCCTTCACACAGT (配列番号 :31)	CTCGTAAAGCTGCATGTCCA (配列番号 :32)	
HS3ST1	NM_005114	ACCACATGCAGAAGCACAAG (配列番号 :33)	TTGAGGGCCTTGAGTCCAC (配列番号 :34)	10
HS3ST2	NM_006043	GGAACCCCACTTCTTTGACA (配列番号 :7)	GTCGAGGAGCCTCTTGAGTG (配列番号 :8)	
HS3ST3A1	NM_006042	ACGCCAGTACTTCGTCAC (配列番号 :35)	GAACGTCAAGCTCTCGAAGG (配列番号 :36)	
HS3ST3B1	NM_006041	ACGCCAGTACTTCGTCAC (配列番号 :37)	TCTGCGTGTAGTCCGAGATG (配列番号 :38)	
HS3ST4	NM_006040	AAGAGCAAAGGTCGGACTCA (配列番号 :9)	ACCCTCTCCTGTCCCACT (配列番号 :10)	20
HS3ST5	NM_153612.3	GCTAGAGGGGAAGGAGAGGA (配列番号 :39)	CCATCGACGACATGAAATTG (配列番号 :40)	
HS3ST6	NM_0010096 06.2	CTGTCCCCTTCTGTTTCGT (配列番号 :41)	CCTTGGTGGCGTTGAAGTAG (配列番号 :42)	
TUBA1A	NM_006009.2	GCAACAACCTCTCCTCTTCG (配列番号 :43)	GAATCATCTCCTCCCCAAT (配列番号 :44)	
TBP (TFIID)	NM_003194.4	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA (配列番号 :45)	CACATCACAGCTCCCCACCA (配列番号 :46)	30

【 0 2 2 5 】

実施例 5 . AD患者 脳脊髄液について :

脳脊髄液(CSF)サンプルは、ADの臨床的特徴を有する患者から腰椎穿刺により得た。患者及びサンプルは、Sarazinら(Habertら, Brain perfusion SPECT correlates with CSF biomarkers in Alzheimer's disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010 ; 37:589-593)により以前に記載されている。AD患者は、ADの予測についての国立神経病、感染症、脳卒中、アルツハイマー病及び関連疾患研究所連合(National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association : NINCDSADRDA)の基準を満たしていた。全ての対象者は、同じ臨床的、生化学的(CSFバイオマーカー測定)及び神経画像検査手順を受けた。全ての患者は、液体減衰反転回復法 (FLAIR)、T1-及びT2-強調シーケンスを含むルーチンのMRI検査を受けた。患者は、巣状病変の臨床上の証拠も神経画像検査上の証拠も示さず、皮質又は皮質下血管病変も示さなかった。AD患者は、種々の程度の皮質及び/又は皮質下萎縮を示すことがあった。患者は、認知行動に干渉する医学的状态を有さず、重篤な抑うつも示さなかった。すべての患者は、診断時から、アセチルコリンエステラーゼインヒビターで治療されていた。患者は、コミュニティで生活していた。

【 0 2 2 6 】

CSF検査

腰椎穿刺により得たCSFサンプルは、10分間1,500rpmで4にて遠心分離して、細胞を

除去し、0.4mlポリプロピレンチューブに小分けして、分析まで - 80 で保存した。

【 0 2 2 7 】

ウェスタンブロッティングによるリン酸化タウ及びHS3ST-2測定用の組織及びCSFタンパク質抽出物の調製

凍結脳組織を液体窒素蒸気下でホモジナイズし、Laemmlい緩衝液 4 × (事前に1:100の -メルカプトエタノールを添加)中に懸濁させた。混合物を5分間煮沸し、5分間超音波処理した。次いで、チューブを10分間遠心分離した(1,500rpm、4)。Pierce(登録商標)BCA Protein Assayキットを製造業者の指示に従って用いて組織ホモジネート及びCSFサンプル中のタンパク質濃度を算出し、等量のサンプルを10%ゲル上で電気泳動させた(Invitrogen Corp)。転写後、膜をブロッキング緩衝液(PBS中3%乳、0.02% Tween-20)で40分間ブロックし、ヤギ抗HS3ST2(T-15, Santa Cruz)で室温にて2時間探査した。膜をPBST中で1回リンスした後、同じ緩衝液中で5分間3回洗浄した。二次抗体をPBST中に希釈し、RTにて45分間インキュベートした(ウサギ抗ヤギ, Jackson Immuno Research)。膜をPBSTでリンスし、同じ緩衝液中で5分間3回洗浄した。プロットを、Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate(Millipore)を製造業者の指示に従って用いて発色させた。

その後、膜をTBS 1 × 中で洗浄し、次いでTBS中1% BSA、0.1% Tween-20(TBST)中に希釈した抗pタウThr231(ウサギポリクローナル, Millipore, ref 9668, lot NG1863963)と室温にて2時間インキュベートした。膜をTBST中で5分間3回洗浄した後、二次抗体(ロバ抗ウサギ, Jackson ImmunoResearch)とインキュベートした。プロットを同じ試薬で発色させた。

【 0 2 2 8 】

脳及びCSFからのグリコサミノグリカン(ヘパラン硫酸及びコンドロイチン硫酸)の抽出及び定量

GAGを脳組織及びCSFから以下のとおり抽出した：凍結脳組織サンプルを粉末にし、ホモジナイズして抽出緩衝液(50mM Tris, pH7.9, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂及び1%のTriton X-100)中に懸濁して最終的に1mL緩衝液あたり25mgの組織とした。CSF又は脳ホモジネートをプロテイナーゼK(PK)(Merck)(最終50µg/mLサンプル)で56 にて一晚処理し、続いて90 にて30分間処理して酵素を不活化させた。室温(rt)まで冷却させた後、DNase I(Qiagen)を加え(7.5mU/mLサンプル)、サンプルを37 にて一晚インキュベートした。次いで、サンプルを4 M NaClで1:1希釈し、遠心分離し(13 000 g, 20分間)、ペレットを廃棄した。脂質を1:1クロロホルム抽出により除去し、記載(Huynhら Neurobiol Aging. 2011)されるような1-9ジメチル-メチレンブルー(DMMB)アッセイに従って総(トータルの)硫酸化GAGを定量した。コンドロイチナーゼABC(ChABC)(Sigma-Aldrich)又は亜硝酸処理を用いて、総GAGサンプル中のHS又はCSを選択的に定量した(Huynhら 2011)。既知量のCS標準物を用いて構築した較正曲線を各アッセイに含ませた。抽出法及び定量法は、GAGをスパイクしたげっ歯類脳サンプルにおいて、以前に記載されたとおりに検証した(Huynhら, Neurobiol Aging. 2011)。

【 0 2 2 9 】

脳及びCSFからのGAG(ヘパラン硫酸及びコンドロイチン硫酸)の単離、抽出及び定量

GAGは以下のとおり単離した：PK/DNase消化サンプルを4 M NaCl最終サンプル濃度にして、10分間激しく攪拌した。TCA処理(10%最終濃度)でタンパク質を沈降させた後、上清をクロロホルム洗浄し、続いて水相の抽出緩衝液及びその後の純水に対する迅速透析(Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units 3,500 MWCO, Pierce)で明澄化した。凍結乾燥後、材料を、水又は必要に応じてグリカナーゼ消化緩衝液(10mM酢酸ナトリウム, 2mM CaCl₂, pH 7)中に溶解させた。次いで、GAGをDMMBプロトコルに従って定量した。抽出HS又はCSの同定及び特異的回収は、以前に記載されたように、HS回収についてはコンドロイチナーゼABC(ChABC)での特異的消化により、CS回収についてはヘパリナーゼI/II/III又は亜硝酸処理により行った(Huynhら, Neurobiol Aging. 2011)。

【 0 2 3 0 】

LC/MSによる脳及びCSFのHS二糖分析

グリカナーゼ消化緩衝液(10mM酢酸ナトリウム、2 mM CaCl₂、pH7)中に溶解した、脳及びCSFから抽出し凍結乾燥させたGAGサンプルを、同時に、ヘパリナーゼI、II及びIIIカクテル(各0.25mU、24時間、37℃)で消化させた。サンプルをろ過後、キャピラリー液体クロマトグラフィシステム(LC)に連結したLTQ/orbitrapから構成されたLC/MSシステムに注入した。使用した分離・検出方法は、Methods Enzymol. 2011又はYangら(Ultra-performance ion-pairing liquid chromatography with on-line electrospray ion trap mass spectrometry for heparin disaccharide analysis. Analytical Biochemistry 415 (2011) 59-66)に記載された方法である。

【0231】

実施例6．アルツハイマー病のGAGはタウ結合能力が増大している

アルツハイマー病及び年齢適合コントロールの海馬からのGAGを、下記のとおり、ELISA競合結合アッセイを用いて、タウタンパク質への結合能力について試験した。図6Aは、アルツハイマー病GAGへのタウ結合能の有意な増大を示す。この効果は、0.1ng/mL GAGについて既に観察されていた。多糖へのタウの50%結合を得るに必要な有効濃度(EC50)の評価により、アルツハイマー病GAGがコントロールと比較して減少していることが示され(図6B)、このことは、疾患例においてタウに対するGAGの親和性が増大していることを意味する。これら結果は、アルツハイマー病による海馬内でのGAG組成変化がより多くのGAGとタウとの結合を生じることを示唆する。

【0232】

ヒトタウタンパク質に対するヘパリン/グリコサミノグリカン競合アッセイ：AD及びコントロール海馬から抽出したGAGのヒトタウタンパク質(R&D systems)への結合を、ELISAベースの競合結合アッセイ(Najjamら, 1997)により評価した。ELISA型96ウェルプレートを用いて、以前に記載されたように調製した2 µg/mL BSA-ヘパリンコンジュゲート溶液(Najjamら, 1997)を用いて被覆した。PBS/0.05% Tween-20(洗浄溶液)で洗浄後、ウェルをPBS中3% BSAで飽和させた。次いで、アッセイするタンパク質(PBS中)を濃度依存的様式でプレートに加えて、固定化ヘパリンに対する50%結合を与えるタンパク質濃度(ED₅₀)を決定した。このデータから、競合アッセイで使用するタウタンパク質量を100ng/mLに固定した。このタウ濃度を使用して、可溶性且つ競合性の抽出GAG(0、0.01、0.1、0.5、1、10、100及び500ng/mL)の存在下で、固定化ヘパリンへのタウ結合の程度に関する変化を調べた。コントロール及びADのGAGとタウタンパク質とを、ヘパリン固定化ウェルに同時に加え、プレートをrtにて1時間インキュベートした。洗浄後、プレートに結合したままのタンパク質を、対応する特異抗体(1:1000、1時間、rt)、続いてペルオキシダーゼ標識二次抗体(1:5000、1時間、rt)で標的した。ペルオキシダーゼ活性を、テトラメチルベンジジン(TMB)検出キット(Pierce)で測定した。年齢適合群のGAGを用いたときに残存するシグナルを参照結合(100%)とした(図21)。

【0233】

実施例7．コントロール及びADのGAG又は3-O-硫酸化されたか若しくはされていないHSオリゴ糖の存在下での脳GSK-3キナーゼによるヒトタウのリン酸化

グリコーゲンシンターゼキナーゼ3(GSK-3)によるリン酸化。組換えhTau41(Millipore)を1単位/mlの組換えGSK3(Millipore)と、50mg/mlのヘパリン、Arixtra(登録商標)又は非3-O-硫酸化ヘパリンヘキササッカリドの存在下又は非存在下で0~24時間インキュベートした。リン酸化アッセイ(0.050ml)を30℃にて行った。リン酸化アッセイは、25mM Tris-HCl、pH7.4、0.1mM EGTA、0.1mM オルトパナジン酸ナトリウム、2.5mM PKI(サイクリックAMP依存性タンパク質キナーゼの特異的インヒビター)、プロテアーゼインヒビター(0.5mM フェニルメチルスルホニルフロリド、5 mg/ml アプロチニン、5 mg/ml ロイペプチン及び0.5 mg/ml ペプスタチン)、タウタンパク質(4 mM)、10mM 酢酸マグネシウム、2 mM [γ-³²P]ATP(約100cpm/nmol)、5単位/mlの組換え再構成GSK3を含んでなっていた。反応はATPで開始させ、10分~24時間の間の種々の時間でアリコートを取り出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びイムノプロットングに使用した。イムノプロットは記載されたように行った(Masato Hasegawaら, J Bio Chem. (1997) 272 (52), pp. 33118-33124)。或いは、W

10

20

30

40

50

hatman P-81紙への吸着後に³²P放射活性の取込みを記載されたように測定した。ヘパリン及び抽出GAGを50mg/mlでアッセイに含ませた。

【0234】

実施例8．タウ過リン酸化ADの変異依存性(hTauP301L)及び変異非依存性(酸化ストレス)細胞モデルにおけるグリコサミノグリカン硫酸化の抑制

2つの細胞タイプを使用した：(i)異常リン酸化が酸化ストレスにより誘導される野生型SH-SY5Y細胞(変異非依存性モデル)、及び(ii)FTDP-17に特徴的な変異hTAU-P301Lを有する完全ヒトタウタンパク質で安定にトランスフェクトされた細胞(変異依存性モデル)。タウ変異の結果として、細胞は高レベルの異常リン酸化タウを示す。

変異依存性モデルについては、細胞を記載されたように培養した(Schaeffer *et al.*, *J Neurobiol* 2006, Jul;66(8):868-881)。変異非依存性モデルについては、ヒトSH-SY5Y神経芽腫細胞を、5%ウシ胎仔血清及びペニシリン/ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地(Gibco)中で増殖させた(5% CO₂及び95%空気)。両モデルについて、細胞を、25cm²ディッシュに10⁶細胞/cm²の密度でプレートし、標準条件下で24時間インキュベートした。次いで、細胞(両モデル)を10 μMレチノール酸(RA)で3日間処理して神経分化を誘導した。

変異非依存性モデルに関しては、次いで、分化細胞をH₂O₂(500mM)で30分間処理し、培地を、RAを補充した新鮮培地に再び交換した。この酸化処理は細胞においてタウのThr231及びSer396での異常リン酸化を誘導する。

酸化剤除去の6時間後。

3日間の分化後、両モデルの細胞を、RA(10 μM)の存在下で、50mMの最終濃度で加えた塩素酸ナトリウム(GAG硫酸化のインヒビター)で処理して分化を維持した。細胞をこれら条件下にて更に24時間インキュベートした。次いで細胞を洗浄し、採集し、抗タウ-pSer199及び抗タウ-pSer396抗体(Millipore)を用いるpタウのフローサイトメトリ分析及びウェスタンブロット分析に使用した。

【0235】

実施例9．タウ過リン酸化ADの変異依存性(hTauP301L)及び変異非依存性(酸化ストレス)細胞モデルにおける3-OST-2(HS3ST2)のサイレンシング

HS3ST2及びHS3ST4 siRNAサイレンシングの効果を、記載した2つのAD細胞モデルにおいて試験したが、クロラート処理を、siRNA(センスについては配列番号73で示すsiRNA、アンチセンスについては配列番号74で示すsiRNA)(10、20、40及び80nM)のリポフェクタミンでのトランスフェクションに置き換えた。全ての場合で、細胞をプレートし、標準条件下で60%コンフルエンスまでインキュベートし、siRNAサイレンシングをhTauP301L細胞においては直接行い、WT細胞についてはH₂O₂ストレスの前後に行った。随意に、サイレンシングを行った細胞及びコントロールをレチノール酸(10 μM)で3日間分化させた。採集した細胞を、抗タウ-pSer199及び抗タウ-pSer396抗体(Millipore)を用いるフローサイトメトリで周知の技法を用いて分析した。少なくとも10000細胞(事象)を分析した。HS3ST2サイレンシングは、HS3ST2転写物のRTqPCR分析により、HS3ST2タンパク質発現についてはウェスタンブロット分析により確認した。

【0236】

ウェスタンブロット分析

細胞を採集後、1 mM Na₃VO₄及び0.1%プロテアーゼインヒビターカクテル(Sigam)を含有する溶解緩衝液(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、1% Triton X-100、1 mM EDTA、10mM NaF、pH8.0)中で氷浴にて5分間インキュベートした。溶解物を遠心分離し、上清中のタンパク質を、BCAタンパク質アッセイキット(Pierce)を用いて定量した。30 μgのタンパク質に相当する抽出物を、組織及びCSFタンパク質サンプルに関して記載したように、電気泳動により分離した。上記の抗タウ-pSer199及び抗タウ-pSer396(Millipore)を用いて異常リン酸化タウを検出した。HS3ST2の分析に関しては、酵素の事前の免疫沈降(milteniキット)が培養細胞中の検出を向上させるために必要であった。タンパク質ローディングを評価するために、膜を直ぐに剥がし、 α -アクチンについて再探査した。結果は、アクチン

に対する標的タンパク質の比として表した。独立実験をコントロールに対して規格化した。

【0237】

実施例10. ゼブラフィッシュにおけるタウタンパク質の過リン酸化の分析

変異した過リン酸化タウタンパク質レベルに対する3-OST発現の効果を調べるために、ニューロン喪失、タウ過リン酸化、凝集、もつれ形成及び行動変化を含むタウオパチーの特性(Paquetら, 2009)を示すhTAU-P301Lトランスジェニックゼブラフィッシュシステムを使用した。まず、5日齢のhTAU-P301Lトランスジェニック胚の脳を過リン酸化タウタンパク質に対する抗体で標識して、タウオパチーを示唆する過リン酸化部位が存在するかどうかを評価した。予想通り、野生型がタウ過リン酸化を全く示さなかったことは対照的に、hTAU-P301L変異体でタウの過リン酸化が観察された(図10A)。更に、過リン酸化タウは変異体の小脳及び脊髄上部領域に位置していただけではなく、終脳にも高度に発現していた。このことは、前脳がタウのミスフォールディングに極度に影響され得ることを示唆する。

異常リン酸化は、同一サンプルで分析した総タウタンパク質レベルに対する異常リン酸化タウレベルの比として古典的に表現される。トランスジェニックゼブラフィッシュでは、異常リン酸化タウレベル/総タウタンパク質レベルは、下記のようにP-タウ及びT-タウELISAアッセイで測定した。トランスジェニックhTAU-P301Lで、異常に過リン酸化したタウタンパク質の蓄積(総タウタンパク質量基準)がWTと比較して90倍上昇していることが観察された(図10B)。更に、A42がこれらサカナに存在するかどうかを決定するために、A42 ELISA分析を行った。予想通り、FTDのこのトランスジェニックhTAU-P301LモデルではA42は観察されなかった。

【0238】

配列番号5の3-OST-2をコードする遺伝子をモルホリノ媒介ノックダウンしたトランスジェニックhTAU-P301L胚及び非注入胚を、24hpfでのDsRed蛍光タンパク質強度に基づいてスクリーニングした。3-OST-2をコードする遺伝子をモルホリノ媒介ノックダウンしたトランスジェニックhTAU-P301Lゼブラフィッシュモデルにおけるタウタンパク質の過リン酸化レベルを調べた。最初に、WTシステムとタウタンパク質のP301L変異を有するトランスジェニックゼブラフィッシュとの交配により得られたゼブラフィッシュ胚に、モルホリノを種々の濃度(0.3mM、0.5mM及び1mM)で注入した。注射の24時間後に生存している胚の数を評価し、生存率を決定した。0.5mMのモルホリノ濃度が主要な異常性も奇形も生じず、モルフォアント間の生存率が最適である(注射の24時間後で67%の生存率)ことが観察された。よって、この濃度を更なる分析に選択した(図12)。

【0239】

トランスジェニックゼブラフィッシュ:hTAU-P301Lを発現するトランスジェニックシステムは、Christian Haas教授の厚意により提供された(Paquetら, 2009)。この動物を記載されたように飼育した。簡潔には、Mosaic DsRedポジティブ幼生を飼育し、野生型サカナと異系交配した。ゼブラフィッシュを28℃にてWesterfield(1995)が記載する標準条件下で維持した。Kimmelら(1995)が記載するように、発生ステージは受精後の時間(hpf)として決定した。全ての実験は、実験脊椎動物のケア及び使用に関する倫理規定(Direction departementale des services veterinaries de Paris)に従って行った。

【0240】

ゼブラフィッシュからの総RNA抽出及びqPCR

総RNAは、WT及びDsRedポジティブゼブラフィッシュサンプルの100の解剖胚のプールから抽出した。RNA抽出は、RNAeasy(登録商標)ミニキット(50)を用いて達成した。HS3ST2発現をmRNAレベルで測定するために、単離RNAから逆転写酵素反応によりcDNAを合成した。簡潔には、総抽出RNA(1µg)を、5mM dNTP及びRNaseインヒビター(Invitrogen)の混合物中でランダムプライマー(30µg/mL)と65℃にて5分間インキュベートした。その後、5×第1鎖緩衝液、1mM DTT及びRNaseインヒビター-Superscript II Rnase H- Reverse Transcriptase(Invitrogen)と42℃にて52分間、70℃にて15分間インキュベートした。転写酵素を含まない混合物をネガティブコントロールとした。qPCRに関しては、プライマーはPrim

er3outputが設計したものをEurofins(Gemany)より入手した(表4)。qPCRに関しは、増幅は、LightCycler(ソフトウェアバージョン3.5; Roche Switzerland)で、FastSart DNA Master SYBR Green I(Roche, Switzerland)を用いて、製造業者が提供する標準的な操作手順に従って行った。1回のアッセイで全てのサンプルを同時に増幅した。相対的定量を上記のように行った(Vandesompeleら, 2002, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3:RESEARCH0034)。

【 0 2 4 1 】

【表 4 - 1】

表4. ヒト及びゼブラフィッシュ(Danio rerio) 3-OSTプライマー

	酵素	アクセッション 番号	オリゴヌクレオチド配列 センス	オリゴヌクレオチド配列 アンチセンス	
ヒト	3-OST- 1	NM_ 005114	ACCACATGCAGAAGCACAAG (配列番号 :33)	TTGAGGGCCTTGTAGTCCAC (配列番号 :34)	10
	3-OST- 2	NM_ 006043	GGAACCCCACTTCTTTGACA (配列番号 :7)	GTCGAGGAGCCTCTTGAGTG (配列番号 :8)	
	3-OST- 3a1	NM_ 006042	ACGCCCAGTTACTTCGTCAC (配列番号 :35)	GAACGTCAAGCTCTCGAAGG (配列番号 :36)	
	3-OST- 3b1	NM_ 006041	ACGCCCAGTTACTTCGTCAC (配列番号 :37)	TCTGCGTGTAGTCCGAGATG (配列番号 :38)	
ヒト	3-OST- 4	NM_ 006040	AAGAGCAAAGGTCGGACTION (配列番号 :9)	ACCCTCTTCCTGTTCCCACT (配列番号 :10)	20
	3-OST- 5	NM_ 153612.3	GCTAGAGGGGAAGGAGAGGA (配列番号 :39)	CCATCGACGACATGAAATTG (配列番号 :40)	
	GAPDH	NM_ 002046.3	CCGTCTAGAAAAACCTGCC (配列番号 :47)	GCCAAATTCGTTGTCATAACC (配列番号 :48)	
	チューブリン	NM_ 006009.2	GCAACAACCTCTCCTCTTCG (配列番号 :43)	GAATCATCTCCTCCCCCAAT (配列番号 :44)	
Danio rerio	TFIID	NM_ 003194.4	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA (配列番号 :45)	CACATCACAGCTCCCCACCA (配列番号 :46)	30
	3-OST- 1	NM_ 00108059 3.1	CGGTGTCTGCACAGCTCTAA (配列番号 :49)	CGACCAGCTCAAAGAACCTC (配列番号 :50)	
	3-OST- 2	NM_ 00108060 8	CTCCAGTACTTCCGGCTGTC (配列番号 :51)	CTGCTGCTCTCTGGCTTCTT (配列番号 :52)	
	3-OST- 3X	DQ81298 7.1	CAGGGAACATAATGCCAAAA (配列番号 :53)	TCTCGCACCACGACTATCAG (配列番号 :54)	
3-OST- DQ81298	GAAGAAACTCGGGCTCCTCT	CGTCTCCTTCGCTCGATTAC			

【表 4 - 2】

3Z	8	(配列番号 :55)	(配列番号 :56)	
	NM_			
3-OST-	00108058	GCTCTTCACCTGGAAAGCTG	AATCCTGCACTTTTGCCATC	
4	9	(配列番号 :57)	(配列番号 :58)	
	NM_			
3-OST-	00103992	ACTTTCGGAAGGGTCTGGAT	GGTGGAGCTGTGAAGTAGCC	10
5	6.1	(配列番号 :59)	(配列番号 :60)	
3-OST-	DQ81299	CACCTGCATCTCCATCCTCT	CTCTCGGCCTGAACTATTGC	
6	1	(配列番号 :61)	(配列番号 :62)	
3-OST-	DQ81299	AAACACCGGGGTATTTACA	TCTTCACCAGCATGTTCTCG	
7	2	(配列番号 :63)	(配列番号 :64)	
	NM_0011	GATACACGGAGCACCAGGTT	GCCATCAGGTCACATACACG	
gapdh	15114	(配列番号 :65)	(配列番号 :66)	20
	NM_1310	CTCTTCCAGCCTTCCTCCT	CTTCTGCATACGGTCAGCAA	
bactin1	31	(配列番号 :67)	(配列番号 :68)	
	NM_2000	GAGCAACAGAGGCAACAACA	GATAGGCGTCATAGGGGTGA	
tbp	96	(配列番号 :69)	(配列番号 :70)	

【 0 2 4 2 】

hTAU-P301Lを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統におけるHS3ST2コーディング遺伝子のモルホリノ媒介ノックダウン

モルホリノオリゴヌクレオチド(MO)は、HS3ST2 mRNA : 5'-ATGGCATATAGGT TCCTGTCAAGCC ... -3'の翻訳をブロックするために、ゼブラフィッシュ3-OST-2遺伝子の隣接領域を標的するように設計した。モルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Gene Tools(LLC One Summerton Way, Philomath, OR, USA)により設計した。MO HS3ST2-ATG : 5'-GGCTTGACAGG AACCTATATGCCAT-3'。

【 0 2 4 3 】

モルホリノ注入

モルホリノを、Danieau緩衝液(58mM NaCl、0.7mM KCl、0.4mM MgSO₄、0.6mM Ca(NO₃)₂、5 mM HEPES pH7.6)に異なる3濃度に希釈し、0.3mg/mLデキストランローダミン(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)と共に注入した。1細胞ステージ又は2細胞ステージのトランスジェニックゼブラフィッシュ胚に、プレッシャーマイクロインジェクター及びZeiss 立体顕微鏡(Zeiss)を用いて約2 nLの0.5mM又は1 mMモルホリノ溶液を微小注入した。3つのモルホリノ溶液を、サカナの生存度、異常性及び奇形について試験した。主要な異常性も奇形も引き起こさなかった生存濃度のみを使用した(0.5mM)。胚をフィッシュウオーター中に28 にて維持した。20hpf後、胚を、メラニン経路中の全てのチロシナーゼ依存性工程のインヒビターである1 × PTU(1-フェニル2-チオウレア)とインキュベートした。卵膜除去(dechoriation)の2日後、DsRedポジティブ胚を選択した：変異サカナに特徴的な顕著な赤色蛍光標識を示す胚のみを、モルホリノの存在についてポジティブと見なした。次いで、胚を48及び120hpfで固定又は解剖した。

【 0 2 4 4 】

ゼブラフィッシュにおける過リン酸化タウタンパク質の免疫細胞化学による分析

50

ゼブラフィッシュ胚を0.64mMトリカイン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)で麻酔し、4%パラホルムアルデヒド中で1時間rtにて固定した。5 dpfの胚を1時間固定した後、脳をPBS中で解剖した。6回のリン酸緩衝液での各5分間の洗浄後、解剖脳又は全胚を、0.2%ゼラチン(Merck, Darmstadt, Germany)及び0.25% Triton X100(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)で1時間rtにてブロッキング及び透過化し、続いて0.02% NaN₃を含有する緩衝液に1:100希釈した一次抗体たる抗PHF-タウ抗体クローンAT8(Thermo Scientific)及び抗PHF-タウ抗体クローンAT180(Thermo Scientific)とインキュベートした。ポジティブDsRed胚を選択するために、1:50希釈した抗DsRed(Clontech)でも標識した。脳又は胚をヤギ抗マウスビオチン化抗体(Vector, 1:400希釈)溶液と1時間30分間rtにてインキュベートし、続いてストレプトアビジンAlexa 488(Molecular probes, 1:400希釈で使用)溶液中で1時間rtにてインキュベートした。脳又は胚をPBS緩衝液中1%アガロース(低融点、Biorad)でマウントした。モルファント表現型の画像を、明視野照明下で、ACT-1ソフトウェア(Version 2.63 Nikon)で制御したデジタルカメラ(DXM 1200F, Nikon)を備えた立体顕微鏡(SteREO Lumar. V12, Zeiss)で記録した。蛍光標識の組合せを、Axiovisionソフトウェアで制御したAxioCam MRmカメラ(Zeiss)を備えるApoTomeシステム(Zeiss)を備えた顕微鏡を用いて画像化した。

10

【0245】

ゼブラフィッシュからのタンパク質抽出及びELISAによるタウ定量

AB系統とP301L変異タウ遺伝子を有するトランスジェニックゼブラフィッシュとの交配により得られた胚を、24hpf及び48hpfにDsRed蛍光タンパク質についてスクリーニングし、卵黄を除去した。50mM Tris HCl pH 8、150mM NaCl、10% Triton X100、1mM EDTA、プロテアーゼインヒビター(カクテル、Roche)、10mM NaF及び1mMオルトバナジン酸ナトリウムを含有する氷冷抽出緩衝液を2倍体積で胚に加えた。組織を超音波処理により断片化し(Branson, Sonifier 250)、4にてホモジナイズした(Stuart rotator SB3)。10 000rpmで30分間の遠心分離後(Eppendorf Centrifuge, Sigma-202 MK)、上清を廃棄した。タンパク質濃度はBradford法に従って測定した。

20

異常リン酸化タウ(P-タウ)は、INNOTEST(登録商標) PHOSPHO-TAU (181P) ELISA(Innogenetics, Gent Belgium)で測定した。モノクローナル抗体HT7(正常タウ及びP-タウのアミノ酸159~163を認識)及びビオチン化モノクローナル抗体AT270(リン酸化スレオニン181残基を含むP-タウを認識)の組合せを用いて、タウオパチー関連病状に特徴的なP-タウ181レベルを測定した。ELISA INNOTESTに備えられた合成ホスホペプチドを標準化に使用した。

30

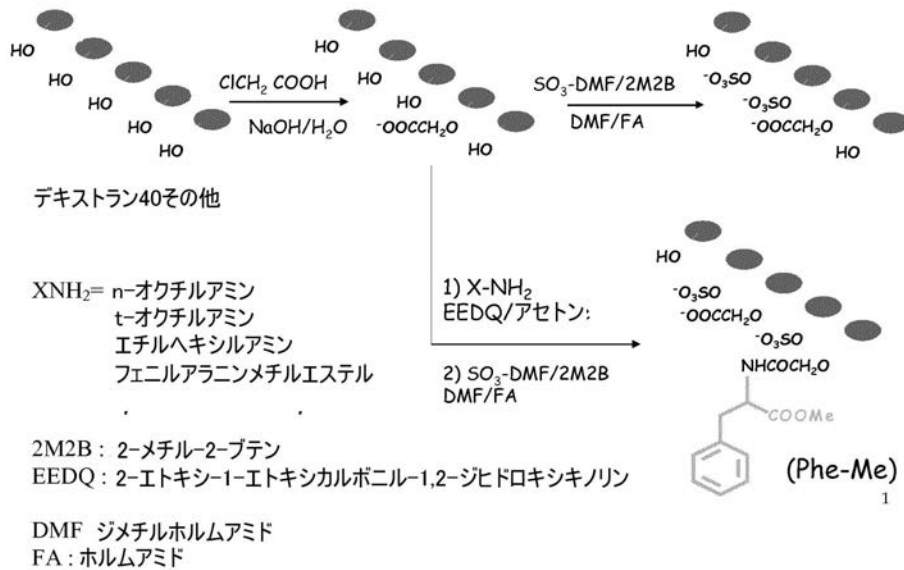
総タウ(T-タウ)は、INNOTEST hTAU-Ag ELISA(Innogenetics, Gent, Belgium)で測定した。このT-タウアッセイは、捕捉用にモノクローナル抗体(AT120)を、検出用にビオチン化モノクローナル抗体(HT7及びBT2)を利用する(Vanmechelenら, 2000)。A 42もまた、INNOTEST™ -Amyloid (1-42) ELISA(Innogenetics, Gent, Belgium)で測定した。

【0246】

実施例11. ヘパラン模擬体(F6及びCR36)合成は、SAMP8マウス脳内でタウの過リン酸化を阻害する

一般的な合成手順を下記に示す：

【化7】



10

【0247】

【表5】

HMs ^a (ref. NMR)	構造的特徴			
	N glu ^b (dp)	dsS ^c (NMR)	dsCM ^d 遊離	X(NH ₂) ^e (PheOMe)
HM-オリゴ.CM _L -S _L -X _L (B)	6 ~ 15	0.22 低	低	低
HM-オリゴ.CM _M -S _L -X _H (C)	6 ~ 15	0.17 低	高	高
HM-オリゴ.CM _M -S _{ML} -X _H (D)	6 ~ 15	0.60 中	低	高
HM-オリゴ.CM _H -S _L -X _H (E)	6 ~ 15	0.20 低	中	高
HM-オリゴ.CM _{ML} -S _M -X _H (F)	6 ~ 15	0.88 中	中	高

20

a: L: 低, M: 中, H: 高

b: 重合化度、サイズ排除クロマトグラフィーで測定

c: 硫酸化度(dsS)、DMMBでのNMR量で測定

d: カルボキシメチル化レベル、¹H NMRで推定e: フェニルアラニンメチルエステル(PheOMe)でのアミドレベル、¹H NMRで推定

30

【0248】

本発明で使用したヘパラン模擬体(HM)は、組織再生特性を有するためにRGTA(組織再生剤ReGeneraTing Agentの略号)としても知られるデキストラン誘導体である。これら化合物は一般式AaXxYy(式中、Aはモノマーを表し、グルコース単位を含み、XはRCOOR'成分を表し、カルボキシメチル成分を含み、YはAと共有結合したO-又はN-スルホネート成分を表し、次の式: -ROSO₃R', -RNSO₃R'(ここで、Rはアミノ酸置換を含む芳香族置換を有し得るアルキル鎖を表し、R'は水素原子又はカチオンを表す)の1つを有し、aはモノマー数を表し、xはモノマーAに連結したX成分の置換度を表し、yはモノマーA上のY基の置換度を表す)を有する。CR36、F6及びこの定義に該当する他の分子は、以前の特許で報告されたように製造される。しかし、本発明で使用する化合物の合成及び構造特徴決定は、下記で特定されるとおりである。F6及びCR36の合成の差は、合成に使用する出発材料

40

50

のデキストランであり、カルボキシメチル化、アミド化及び硫酸化反応は同じである。

【0249】

デキストランのカルボキシメチル化：F6については、デキストランT5(MW = 5000Da)を出発材料として使用した。CR36については、デキストランT10(MW = 10000Da)を出発材料として使用した。デキストラン(30 g、0.185モルのグルコース)を146mLの水に溶解させ、別途に59.2 gのNaOH(1.4モル)を59mLの水に溶解させた。両溶液とも4℃に冷却した。NaOH溶液をデキストラン溶液に攪拌下で15℃を超えないように温度を制御しながらゆっくりと注いだ。反応混合物を20分間攪拌した後、4℃まで冷却した。モノクロロ酢酸(61.3 g、6.5モル)を少量ずつ、反応温度を<20℃に制御しながら加えた後、反応混合物を50℃にて40分間攪拌した。次いで、反応を終了させ、得られる水溶液を分子量1000のカットオフ膜でタンジェンシャル限外ろ過により精製し、続いて記載のように凍結乾燥させた。より高いカルボキシメチル含量を有する生成物を製造するためには、同じ手順を2回又は3回繰り返し、所望のdsCMを得た。

10

D6、D4及びE5は類似の方法で合成する。

【0250】

アミド化反応。CMD(5 g、dsCM 1.1、21.5ミリモルのCOO⁻)を136mLの水に溶解させた後、71mLのアセトンを加えた。温度を40℃に維持した。カルボキシル官能基を活性化させるため、20mLのアセトン中5.3 gの2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリン(21.5ミリモル)を加え、反応混合物を20分間40℃にて攪拌した。最終溶媒は比60/40の水とアセトンから構成された。次いで、フェニルアラニンメチルエステル(21.5ミリモル)を加え、HCl 4 MでpHを7に調整した。反応物を40℃で一晩攪拌した。得られる水溶液のタンジェンシャル限外ろ過により最終生成物を精製し、続いて凍結乾燥させた。

20

【0251】

2M2Bの存在下での硫酸化多糖のSO₃-DMF媒介合成。10g/LのCMDPh水溶液(24.3ミリモルのグルコース)を40mLのホルムアミド及び160mLのDMFに溶解させた。完全な溶解後、40mLの2M2B(26.5 g、378.6ミリモル)をゆっくりと加えた。SO₃-DMF複合体(7.4 g、48.6ミリモル)を迅速に加え、反応混合物を30℃にて2時間攪拌した。200mLのNaHCO₃中にゆっくりと注いで反応を終了させ、上記のとおり、最終生成物をタンジェンシャル限外ろ過により精製し、続いて凍結乾燥させた。アミド化生成物は硫酸化前にはプロトン化していなかった。

【0252】

生成物の精製及び構造特徴決定

生成物の精製は、1000通常分子量カットオフ(NMWC0)の再生セルローズ膜(Pellicon2、0.5m²、Millipore, MA)で5 LのNaCl 1 M、次いで20 LのMilli-Q水に対してタンジェンシャル限外ろ過で体系的に達成した。得られる濃縮溶液を凍結乾燥させた。Universal mill A10 IKA(IKA-WERKE GMBH & CO. KG, Germany)により、純粋な乾燥生成物をホモジナイズして微粉末を得た。200 MHz Brukerスペクトロメータ及び600 MHz Varianスペクトロメータを用い、残留H₂Oピークを標準として使用してD₂O中のサンプルからの¹H NMRスペクトルを記録した(4.805ppm)。分子量の絶対値測定及びサイズ分布は、多糖溶液について0.1M LiNO₃に溶出させるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により行った。これには、差分屈折率検出器(RI, ERC 7515A, Erma Cr. Inc., France)と直列に接続した多角レーザ光散乱光度計(MALLS; Dawn DSP-F, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA)と組み合わせた。TSK Gel G3000 PWXL(TosoHaas, Cambridge, U.K.)カラムを多糖分析に使用した。置換度(ds)は、置換カルボキシメチル基の数(dsCM)、置換カルボキシメチルアミドの数(dsX)及びスルフェート基の数(dsS)として定義した。

40

【0253】

F6 : 0.61CM、0.15L-Phe(OMe)、0.7 S

ここで、CMはカルボキシメチル基に相当し(61%、20~150%含量が可能)、Sはスルフェート基に相当し(70%、20~150%含量が可能)；L-Phe(OMe)は15%で存在する(0~50%置換が可能)。

50

- CR 36 : T10から製造(NHX = L-Phe(OMe))、これは以下の置換度を有する : 59CM、22L-Phe(OMe)、83 S。

ここで、CMはカルボキシメチル基に相当し(59%、20~150%含量が可能)、Sはスルフェート基に相当し(83%、20~150%含量が可能); L-Phe(OMe)は22%で存在する(0~50%置換が可能)。

【0254】

SAMP8マウスのF6での処置

合計60匹の5ヶ月齢雄性SAMP8及び14匹の5ヶ月齢SAMR1(正常コントロール)を、クリーニンググレードの動物舎において22~24にて55±5%の湿度で12時間の明暗サイクルで飼育した。全てのマウスを標準飼料で飼育した。SAMP8及びSAMR1の平均寿命はそれぞれ15±2ヶ月及び30±3ヶ月であった。全てのマウスを5日間順応飼育した後に、60匹のSAMP8マウスを体重に従って各群15マウスの6群に分けた: モデル群、フペルジンA群、F6高用量群(F6 H、50mg/kg)及びF6低用量群(F6 L、50mg/kg)。フペルジンA群には、3.86 µg/KgのフペルジンA(ヒト臨床用量と等価、正常ナトリウムに溶解)を1日1回経口投与した; F6 H群には、50mg·Kg⁻¹ F6(正常ナトリウムに溶解)を4日毎に1回腹腔内注射した; F6 L群には、25mg·Kg⁻¹ F6(正常ナトリウムに溶解)を4日毎に1回腹腔内注射した; モデル群及びSAMR1正常コントロール群(コントロール)には、等価用量の溶質(200 µL精製水)を1日1回経口投与した。全ての群を2ヶ月間処置した後、行動及び分子生物学検出を行った。

10

【0255】

行動及び分子生物学検出:

SAMの学習及び記憶能力に対するGAGアナログの効果の測定

行動検出を順次行った: 定位ナビゲーション(place navigation)(1~4日目)、空間探索試験(5日目)及びフットショック回避試験(8~9日目)。定位ナビゲーションモリス水迷路(MWM)検出は、報告された文献を参照し、若干の変更を加えて行った(参考文献)。各群における、逃避潜時、遊泳距離、異なる四分円内での滞留時間、異なる四分円内での遊泳路長、全遊泳路長、遊泳速度、逃避成功パーセンテージを調べた。実験前に、マウスを先ず、水面下のプラットフォームに15秒間置き(順応期)、次いで第1四分円内及び第3四分円内のそれぞれで水中にプール壁に向けて置いた。マウスに90秒間MWM中を自由に遊泳させ、5秒を超えるプラットフォーム滞留時間を、プラットフォーム探知の成功と見なし、水中に入れてからプラットフォーム探知の成功までの時間を逃避潜時として用いた。マウスが90秒以内にプラットフォームに到達できなかった場合、逃避潜時は90秒として記録した。毎日の平均逃避潜時を算出して、空間記憶の獲得能力を評価した。全てのマウスを4日間継続して訓練し、各群においてプラットフォーム探知に成功したマウスのパーセンテージ(泳いで水から出た率)を毎日算出した。

30

【0256】

空間探索試験。定位ナビゲーション終了翌日(5日目)にプラットフォームを移動した。各マウスを第3四分円から90秒間自由に遊泳させた。90秒の間の、(定位ナビゲーション測定中にプラットフォームが位置していた実際の位置を横切る)環帯横断数、同じプラットフォーム内での遊泳距離率及び遊泳時間率(マウスにつき、全遊泳距離又は全遊泳時間に対する第3四分円のプラットフォーム内での遊泳距離及び時間のパーセンテージ)を記録して、空間記憶獲得能力を評価した。

40

【0257】

フットショック回避。MWM試験終了2日後、マウスにフットショック回避試験を行った。跳躍装置は方形で、8室を有していた。各室の底には帯電した銅製細網が備えられ、電圧はコンピュータにより制御・調節でき、この実験では40Vの電圧を使用した。各室の底には、絶縁された直径5cmの円形プラットフォームが同じ側に備えられ、その周囲にはフェンダーが設けられ、観察者に対面する天板側は透明であり、他の側は不透明であった。室の天板は取り外し可能であり、マウスを出し入れできた。マウスは、絶縁プラットフォーム内に立って、電気ショックを回避できた。実験は二相: 記憶獲得及び記憶固定からなっ

50

た。

【0258】

記憶獲得実験。マウスを室に2分間入れて環境に慣らした後、実験開始時に銅製細網上に置き、5分間スイッチを入れた(40V)。電気ショック後マウスが最初に絶縁プラットフォーム上に逃避する潜時、5分間のうちのプラットフォーム上での時間(安全領域にいる時間)、電気ショックを受けた時間(誤った領域にいる時間)、電気ショックの時間及びマウスが電気ショックを受けた頻度を学習成績として記録して、受動回避応答の能力を判断した。

【0259】

記憶固定実験。記憶獲得実験終了翌日、マウスをプラットフォーム上に載せて、スイッチを5分間入れた。プラットフォームから銅製細網上に最初に飛び降りた時間(潜時)、安全領域(プラットフォーム上)にいる時間、誤った領域(銅製細網上)にいる時間、電気ショックの頻度及びマウスが電気ショックを受けた数を記録して、記憶成績を評価した。

10

【0260】

ウェスタンブロット。フットショック回避試験終了後、2/3のマウスから眼球摘出により血液を採集したのち、屠殺した。全脳を氷上に取り出し、プールした正常ナトリウムで洗浄して血液を除いた後、左右の大脳皮質及び海馬領域をそれぞれ分離し、凍結チューブに入れ、最後に液体窒素中に保存した。各群3匹のマウスの左海馬領域及び大脳皮質を秤量し、1mLのタンパク質溶解液[50mM Tris-HCl(pH8.0)、150mM NaCl、1% Triton X-100、1mM EDTA、10mM NaF、1mM Na₃VO₄、カクテルインヒビター1%]を氷上の20mg粉砕サンプルに30分間加えた後、13,000rpmで15分間4にて遠心分離し、上清を回収し、-80にて保存した。BCAキットを用いてタンパク質含量を測定した。合計30µgのタンパク質を回収してウェスタンブロットを行った。SDS-PAGE後、タンパク質をPVDF膜に4で転写し、3% BSAで1時間ブロックした後、一次抗体を加えて一晚4にてインキュベートした。以下の一次抗体を使用した：抗タウ1(1:200)、抗タウ5(1:500)、抗pタウ199/202(1:1,000)、抗pタウ231(1:1,000)、抗pタウ404(1:1,000)。蛍光標識二次抗体を加え、暗所で室温にて1時間インキュベートした。最後に、Odyssey赤外画像化システムを使用して、バンドをスキャンし、分析した。

20

【0261】

蛍光免疫組織化学。サンプル処理。フットショック回避試験終了後、1/3のマウスに0.1M PBSを5分間、4%パラホルムアルデヒド(0.1M PBS、pH7.4)を10分間心臓内灌流し、マウスの肝臓及び腸が白くなり、尾が攣縮したら、全脳を迅速に取り出し、4%パラホルムアルデヒドで24時間固定した後、(0.1M PBS、pH7.4中)20%スクロース溶液に一晚4に入れて置いた。その後、脱水手順を行った：50%アルコールに36時間、70%アルコールに48時間、80%アルコールに6時間、95%アルコールに4時間(×2)、100%アルコールに3時間(×3)、ジメチルベンゼンに1.5時間(×2)、パラフィンワックスに4時間(×2)。最後に、サンプルをパラフィン包埋し、5µm厚の連続切片とした。

30

【0262】

蛍光染色：各々決定した指標の非特異的二次免疫染色及び非特異的二次免疫染色においてポジティブ染色が観察されなかったことに基づいて蛍光染色の実験形式を開発した。

40

脱パラフィン化：ジメチルベンゼンに5分間3回、100%アルコールに3分間2回、95%アルコールに1分間、70%アルコールに1分間、50%アルコールに1分間、水で5分間洗浄。

抗原回収：100にて20分間のシトレート水浴、水で10分間洗浄、PBSで5分間1回の洗浄。抗原ブロッキング：3% BSAで30分間室温にてブロックした。内因性ビオチンブロッキング：キットの指示書に従って行った。溶液A及びBでそれぞれ15分間ブロックした。一次抗体：1% BSA+0.2% Triton X-100+PBSで希釈し、一晚4にてインキュベートした。抗タウ5(1:100)、抗pタウ199/202(1:100)、抗pタウ231(1:100)、抗pタウ262(1:200)、抗pタウ396(1:100)、抗CS(1:100)、抗カテプシンD(1:100)、抗カテプシンB(1:50)、抗HS(A04B08)(1:20)。二次抗体：1% BSA+0.2% Triton X-100+PBSで希釈し

50

(1:200)、暗所で室温にて1時間インキュベートした。HSは報告された文献(Ottenheimら, 2007)を参照し、抗VSVは希釈して(1:5)、室温にて1時間インキュベートした後、染色を行った。

シグナル増幅。キットの指示書に従って行い、それぞれ2滴の溶液A及びBを10mLのPBS中に加え、暗所で30分間室温にてインキュベートした。呈色：5mlのTris-HCl(0.1M、pH 8.2)に、レバミゾール溶液を1滴並びにキットの溶液A、B及びCをそれぞれ2滴加え、暗所で20分間室温にてインキュベートした。DAPI染色：1 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ DAPIを使用して3分間室温にて染色した。マウントし、暗所で4 にて保存した。適時写真を撮影した。

【0263】

実施例12. 分化又は未分化SH-SY5Y細胞におけるA₄₂神経毒性に対するF6及びCR36処理
F6及びCR36を、分化及び未分化ヒトSH-SY5Y細胞(Datkiら, 2003)において、A₄₂毒性を改変する能力についてアッセイした。未分化SH-SY5Y細胞は、10% FBSを補充したDMEM中37 にて5% CO₂で維持した。アッセイのために、細胞を96ウェルプレートに15,000細胞/ウェルで播種し、10% FBSを補充したDMEM中24時間維持した。分化細胞アッセイのために、培地に10 μM レチノール酸(Sigma-Aldrich)を補充し、細胞を3日間分化させた。未分化細胞アッセイについてはレチノール酸処理を行わなかった。ヒトA₄₂ペプチド(Sigma-Aldrich)を、水溶液(50 μM)中で、rtにて3日間穏やかに振盪させることにより、即席に凝集させた。次いで、凝集A₄₂を分化又は未分化細胞に10 μM の最終濃度で加えた。このA₄₂ペプチド濃度は、50%近辺の細胞生存度が得られるように用量-効果実験により固定した(データは示さず)。F6、CR36又はコントロール生成物(LiCl₂、ヘパリン、エノキサパリン、DMMB)を細胞に0.01、0.1又は1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度で10 μM の凝集A₄₂ペプチドと共に加え、細胞を1日間インキュベートした。MTTアッセイ(Mosmann, 1983)で細胞生存度を測定した。簡潔には、培地を交換し、10 μL のMTTストック溶液(5 mg/mL)を各ウェルに加えた。細胞を2時間rtにてインキュベートし、MTT溶液を廃棄した。DMSOを各ウェルに加え、光学密度を560nmで読み取った。光学密度は、分化及び未分化の両方の細胞についての較正曲線(データは示さず)により、細胞数に直接相関させた。

【0264】

実施例12. 血液脳関門(BBB)通過

血液脳関門(BBB)透過性研究を、hCMEC/D3細胞単層において、以前に記載されたように作製したBBB細胞(B. B. Wekslerら; FASEB J. 2005 Nov;19(13):1872-4)で行った。簡潔には、トランスウェルポリカーボネートインサートフィルターで、異なるサイズの分子に対するBBBの透過性を測定した。HCMEC/D3細胞をフィルター上にEGM-2培地中2 $\times 10^5$ 細胞/cm²のコンフルエント密度で播種した。48時間後、F6、CR36、HM2602及びオリゴデキストランを含むアッセイ分子を上部チャンバに加え、下部チャンバを10分間隔でサンプリングし、硫酸化糖を検出するためのDMMB法を用いて、細胞に覆われたインサートを通過する分子を測定した(図22)。

データ分析

データ分析は、Prism 5.0(GraphPad Software Inc., CA)ソフトウェアを用いて行った。データは平均 \pm SEMとして示した。対応のある比較は二試料t検定及びマンホイットニー検定を用いて行い、多重比較は一元ANOVAを用いて行った。

【0265】

結論

ヒトアルツハイマー海馬において、タウに関するGAG結合親和性の増大が観察された。更に、アルツハイマー病では、(核の周囲で濃い)HS及び過リン酸化タウの共存に伴う強力な染色が観察された。これら結果は、アルツハイマー病でHS含量が上昇することを示した。HSのこの上昇は、HSの構造及び組成変化を伴い、転写物過剰発現で検知される推定の3-O-硫酸化増加を伴っていた。3-O-硫酸化は、ヘパリンに特徴的に見出されるHS生合成の改変であり、3-O-スルホトランスフェラーゼ(3-OST)により行われる。3-OSTにより改変されたHSは、その後、アルツハイマー病で重要な役割を演じ得る。2つの3-OSTイソフォーム

の発現は、アルツハイマー病脳で顕著に上昇した。我々の結果は、ヘパリンにより誘導されるタウ立体構造変化がタウの過リン酸化を誘導し得ることを示す文献データにより補強されるが、アルツハイマー病脳由来のHSにおける稀な硫酸化パターンの病的徴候が病理に關与している可能性を示唆する。3-OSTに対応する転写物の存在が、本研究で使用したトランスジェニックhTAU-P301Lゼブラフィッシュモデルにおいて確認された。このモデルはまた、タウタンパク質の異常な過リン酸化により特徴付けられる。

ここで、モルホリンによる3-OST-2発現の減少によって、異常タウ過リン酸化の蓄積が顕著に減少することがインビボで証明されている。このことは、リン酸化プロセスにおけるHSの必須要件を強力に示唆する。特に、HSの構造及び組成は、病的タウ改変に3-O-硫酸化を必要とするようである。

【0266】

3-OST-2のサイレンシング後の過リン酸化タウ蓄積の減少は、3-O-硫酸化HSがタウタンパク質とキナーゼ及び/又はホスファターゼとの間の相互作用を刺激すること、又はHSの特定の硫酸化シーケンスがキナーゼ及び/又はホスファターゼに関するタウ親和性を調節し得ることを示唆する。

アルツハイマー病に存在する3-O-硫酸化HSの構造に誘導される変化、続く3-OST-2の阻害は、微小管分解及び該タンパク質の重合化(この重合化は不溶性PHFの形成をもたらす)を促進する可能性のあるタウ立体構造変化を予防し得る。これら変化は、タウをホスファターゼに曝して、リン酸化タウ蓄積レベルの低下を導き得る。幾つかの証拠が、オリゴマー形態のタウもまた、疾患病理に或る役割を有し得、タウ凝集を標的する薬剤を用いるNFTの解体がおそらくは利用可能なタウオリゴマー量の上昇を生じ得ることを示唆する。このように、3-OST-2の阻害は、細胞を、タウ異常リン酸化、微小管分解及びPHF形成から保護する。

この研究の結果は、タンパク質キナーゼの阻害又はNFT脱凝集ストラテジ以外のアプローチでタウリン酸化を標的することの実現可能性を示唆する。インビボにてタウのリン酸化に対する3-OST-2モルホリンの阻害効果及び/又は細胞におけるsiRNAの使用により、阻害効果の機序に関する更なる研究が可能になる。

【0267】

実施例13：A ペプチド神経毒性保護アッセイ

F6又は他のHMを、分化及び未分化ヒトSH-SY5Y細胞(Datkiら, 2003)において、Ab42毒性を改変する能力についてアッセイした。未分化SH-SY5Y細胞を、10% FBSを補充したDMEM中37℃にて5% CO₂で維持した。アッセイのために、細胞を96ウェルプレートに15,000細胞/ウェルで播種し、10% FBSを補充したDMEM中24時間維持した。分化細胞アッセイのために、培地に10 µMレチノール酸(Sigma-Aldrich)を補充し、細胞を3日間分化させた。未分化細胞アッセイについてはレチノール酸処理を行わなかった。示されたとおりのヒトA₂₅₋₃₅ペプチド又はA₄₂ペプチド(Sigma-Aldrich)を、水溶液(50 µM)中で、rtにて3日間穏やかに振盪させることにより、即席に凝集させた。次いで、凝集A₄₂を分化又は未分化細胞に、A₄₂については10 µMで、A₂₅₋₃₅については25 µMで加えた(最終濃度)。このA₄₂ペプチド濃度は、50%近辺の細胞生存度が得られるように用量-効果実験により固定した(データは示さず)。F6又は他の分子を細胞に1又は10 µg/mLの最終濃度で凝集A₄₂ペプチドと共に加え、細胞を1日間インキュベートした。MTTアッセイ(Mosmann, 1983)で細胞生存度を測定した。簡潔には、培地を交換し、10 µLのMTTストック溶液(5 mg/mL)を各ウェルに加えた。細胞を2時間rtにてインキュベートし、MTT溶液を廃棄した。DMSOを各ウェルに加え、光学密度を560nmで読み取った。光学密度は、分化及び未分化の両方の細胞についての較正曲線(データは示さず)により、細胞数に直接相関させた。

【0268】

タウのウェスタンブロットティング：p-タウの検出のために、タウ180抗体(Thermo Fisher Scientific Inc., 3747 N Meridian Rd, Rockford, IL USA 61101から市販)を用いて、タンパク質抽出物(30 µgのタンパク質)をブロットした。

この研究で使用したヘパラン硫酸模擬体の構造的特徴(実施例13)

10

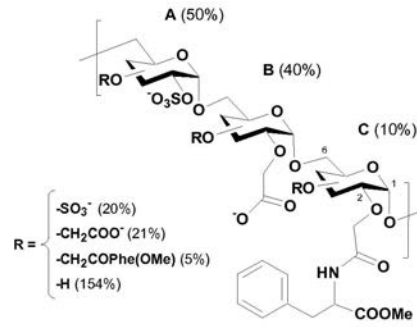
20

30

40

50

【化 8】



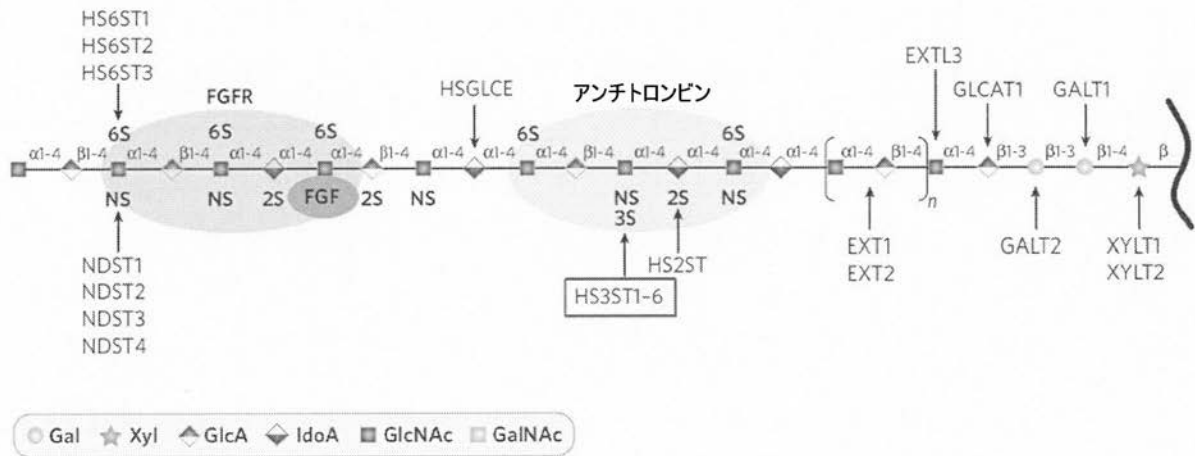
10

抗タウHMの構造的特徴

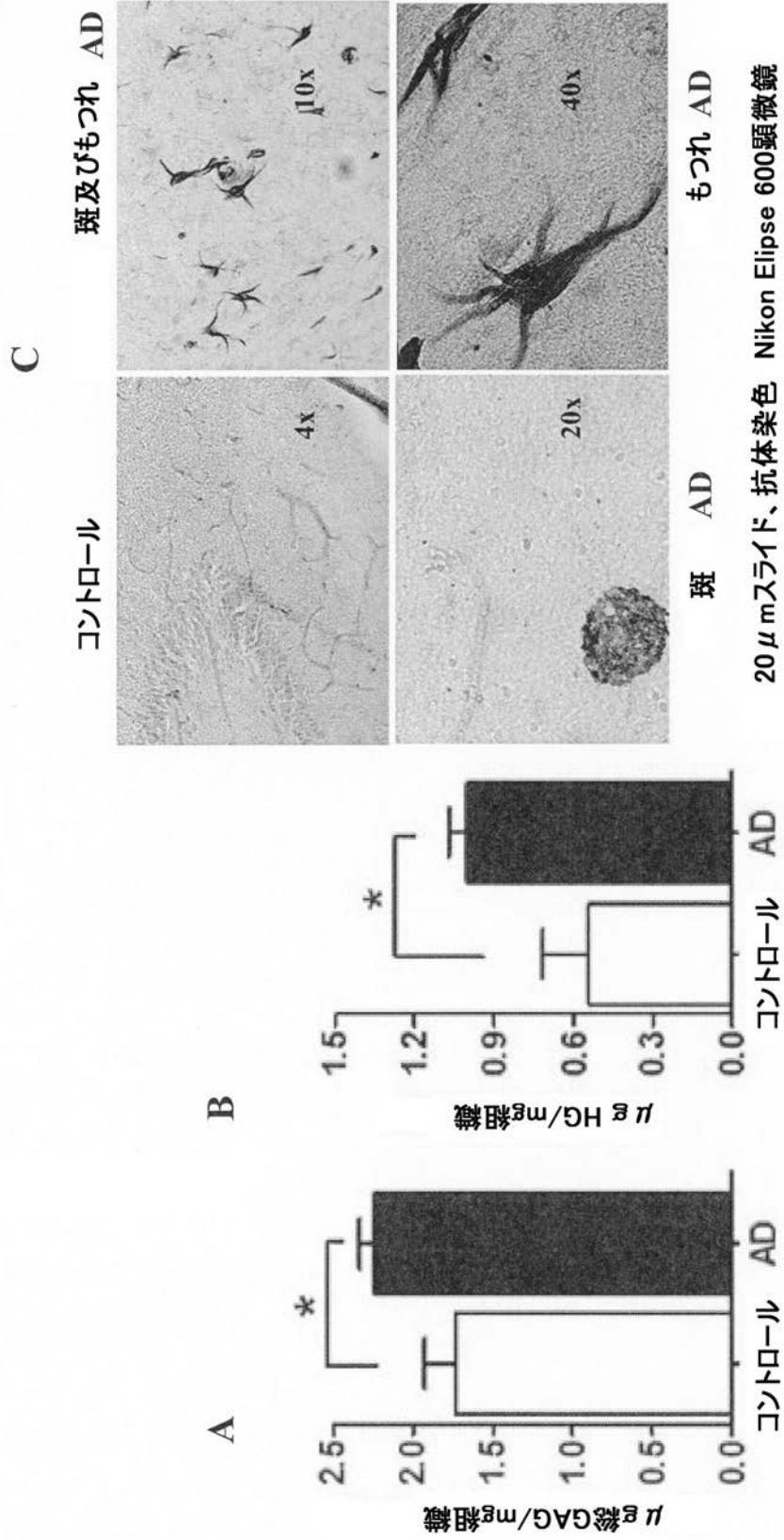
	グルコース数 (dp)	dsS	dsCM	ds 疎水性
デキストラン (Dx)	~250	0	0	0
D4	~50	0.2	0.75	0
E5	~50	1	0.5	0
D6	8-15	1.2	0.6	0.2
F6	~33	0.7	0.75	0.15

結果を図25～29に示す。

【図 1】



【 図 2 】

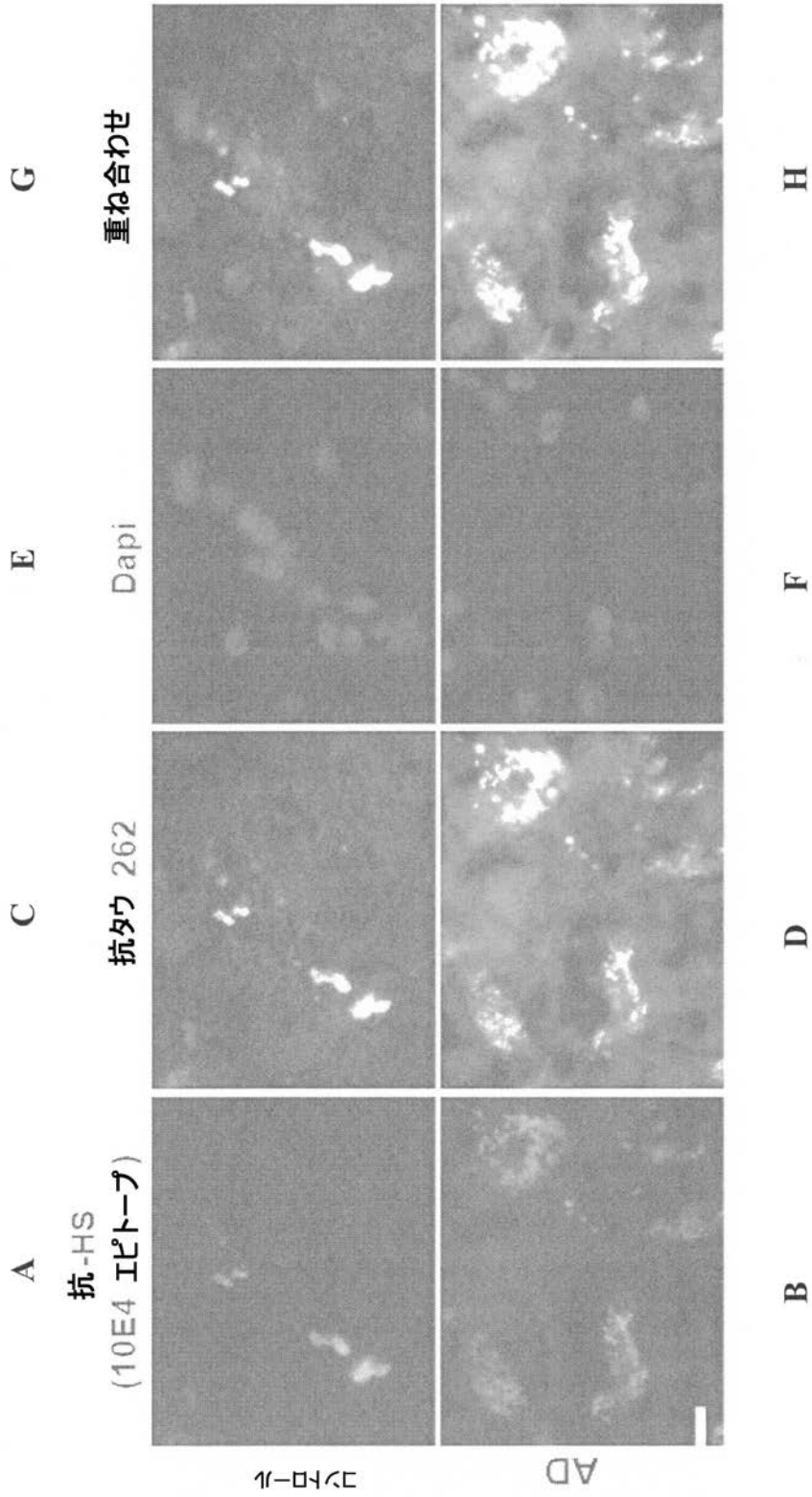


【 図 3 】

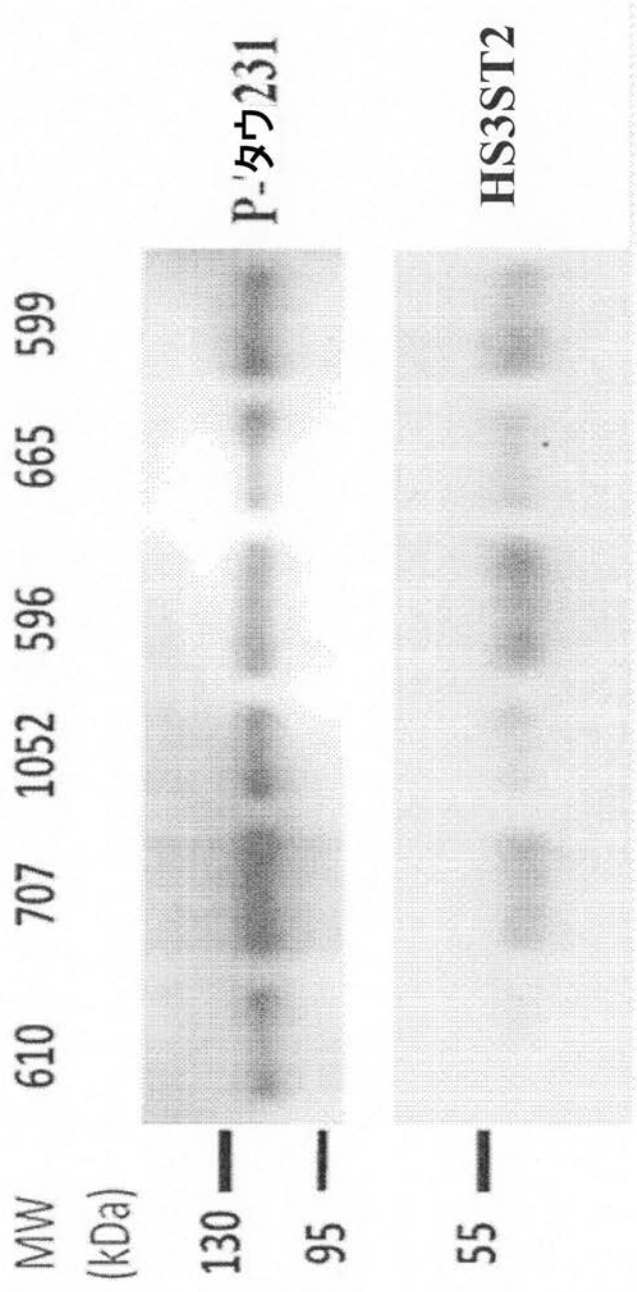
標的	酵素	アイソフォーム	発現 AD対コントロール
△パラチン硫酸	N-テアセチラーゼ/N-スルホトランスフェラーゼ	NDST-1	NS
		NDST-2	↑*
		NDST-3	ND
		NDST-4	ND
	D-グルクロニル G5-IPメラーゼ	GLCE	↑*
		2-OST	↑*
		6-OST-1	↑*
	2-O-スルホトランスフェラーゼ	6-OST-2-Var1	↑*
		6-OST-2-VarS	NS
		6-OST-3	NS
	3-O-スルホトランスフェラーゼ	3-OST-1	NS
		3-OST-2	↑**
		3-OST-3a1	↑*
		3-OST-3b1	↑*
コンドロイチン硫酸	炭水化物(N-アセチルガラクトサミン 4-O)スルホトランスフェラーゼ8	3-OST-4	↑***
		3-OST-5	NS
		3-OST-6	ND
		CHST8 Var1	NS
		CHST8 Var2	NS
		CHST8 Var3	NS
その他	ヘパラーゼ	HSPE	↑*
	グルタミンジンセターゼ	GS	↑**
	グリセラルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	GAPDH	↑*
	ケモカイン(C-X-C)レセプター-4	CXCR4	NS

NS: 酵素発現に有意差なし
 ND: 酵素検出なし

【 図 4 】

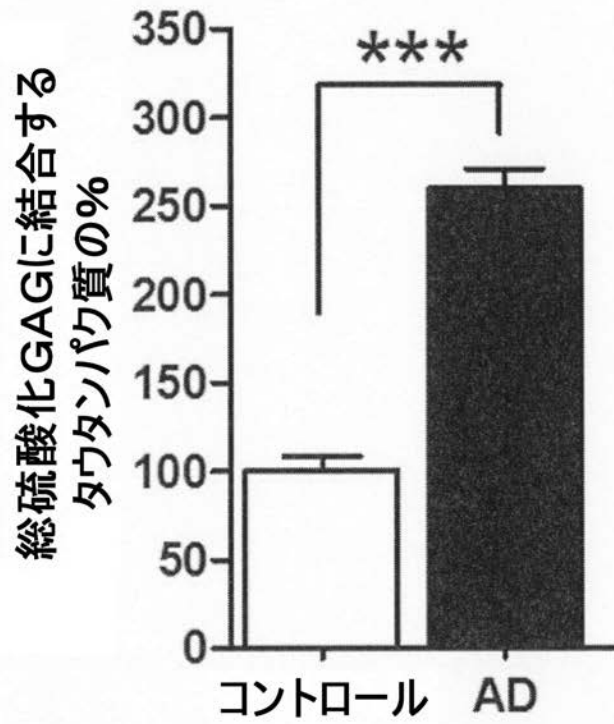


【 図 5 】



【 図 6 】

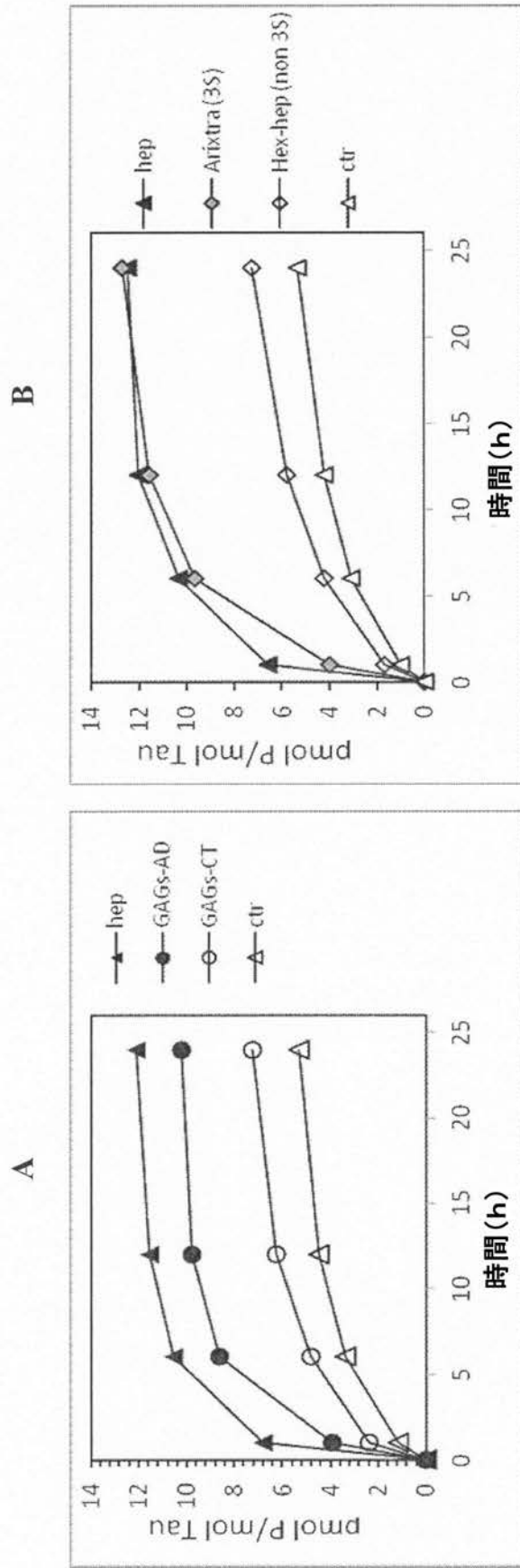
A



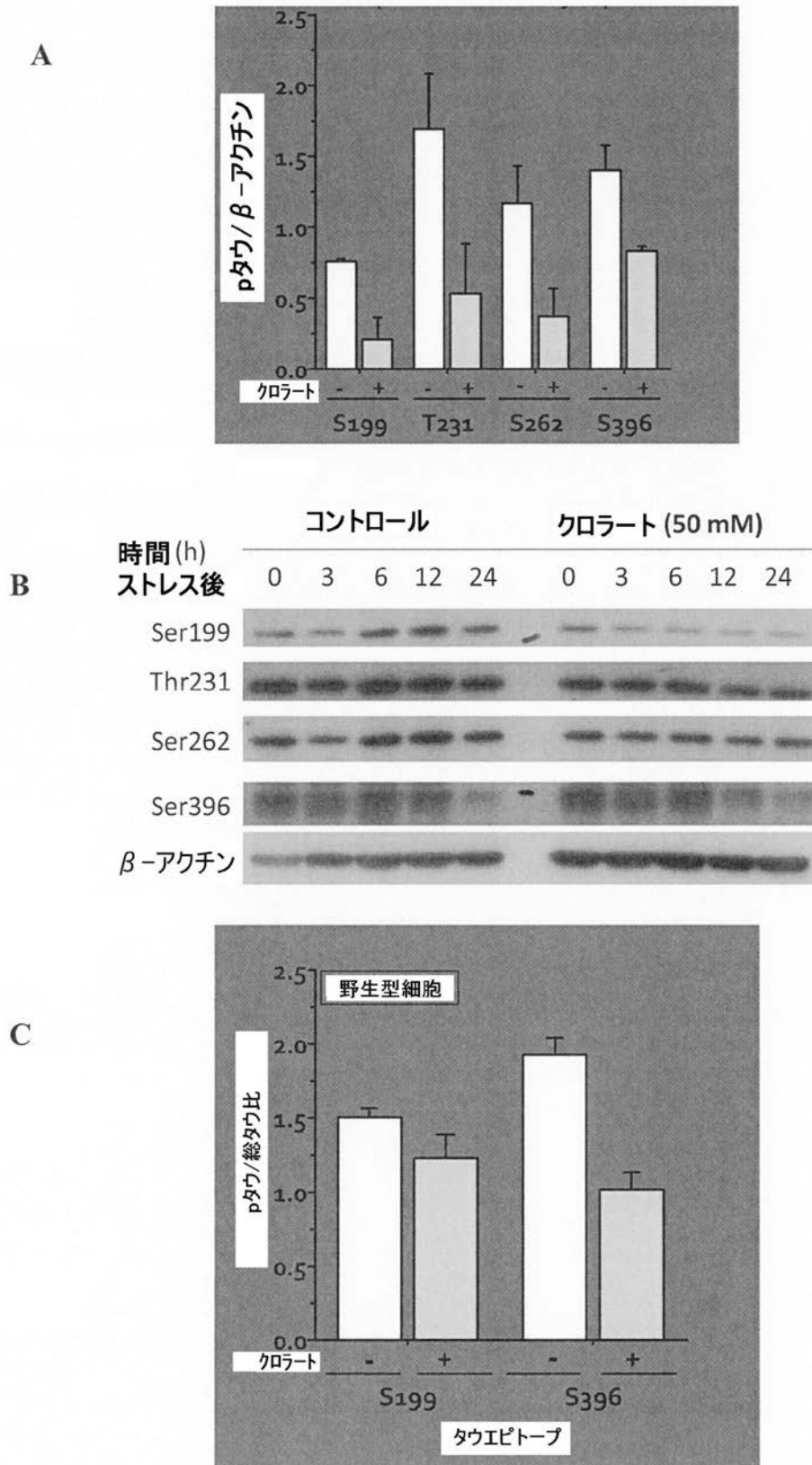
B

タンパク質	EC ₅₀		AD 対 コントロール (倍)
	コントロール	AD	
タウ	2.70 ± 0.42	0.52 ± 0.11	5.2 ↓***

【 図 7 】

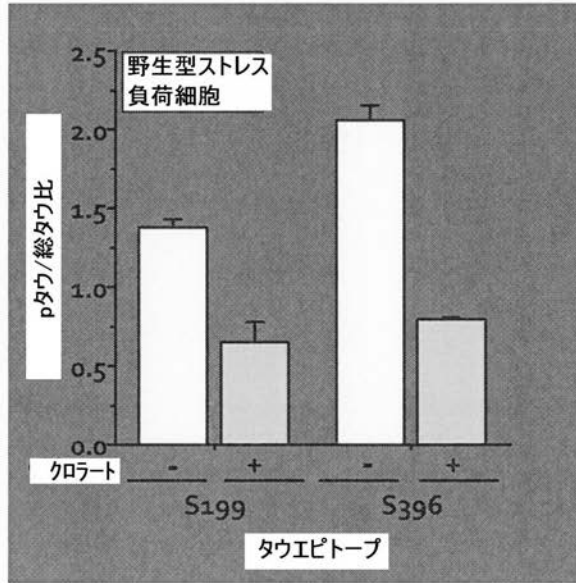


【 図 8 - 1 】

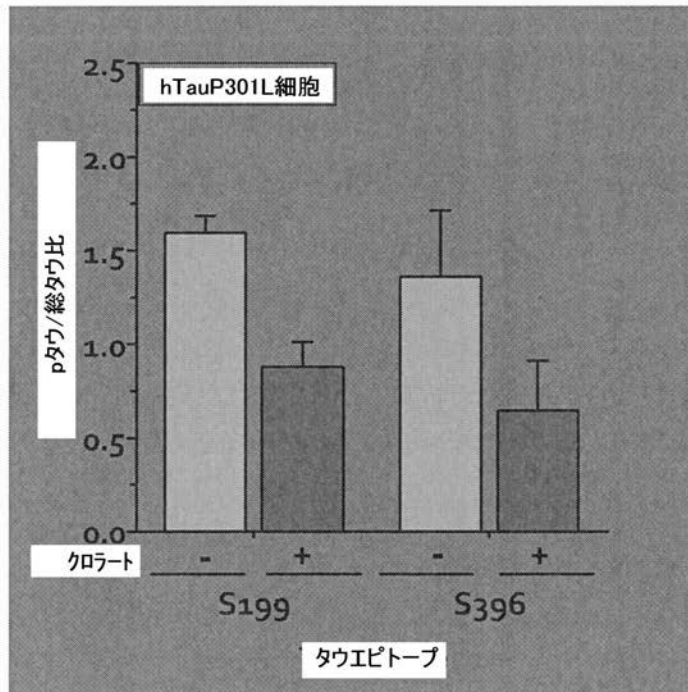


【 図 8 - 2 】

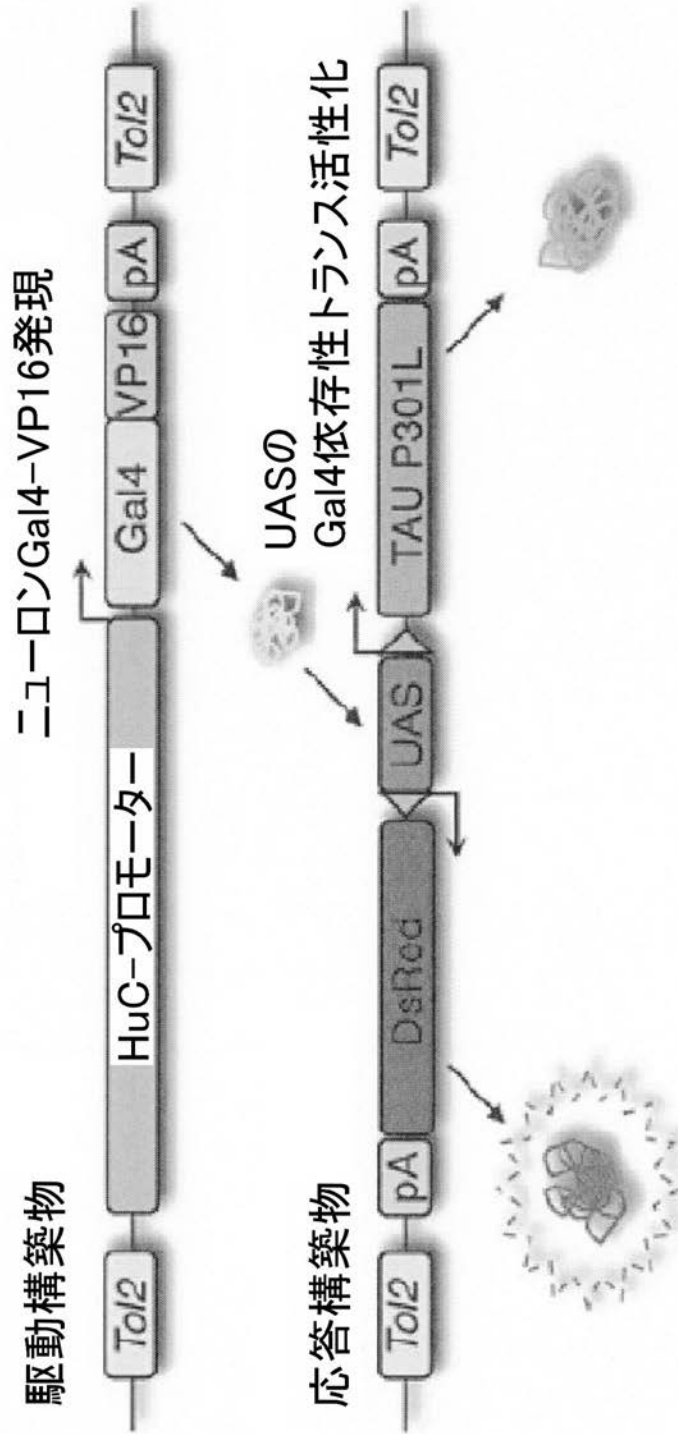
D



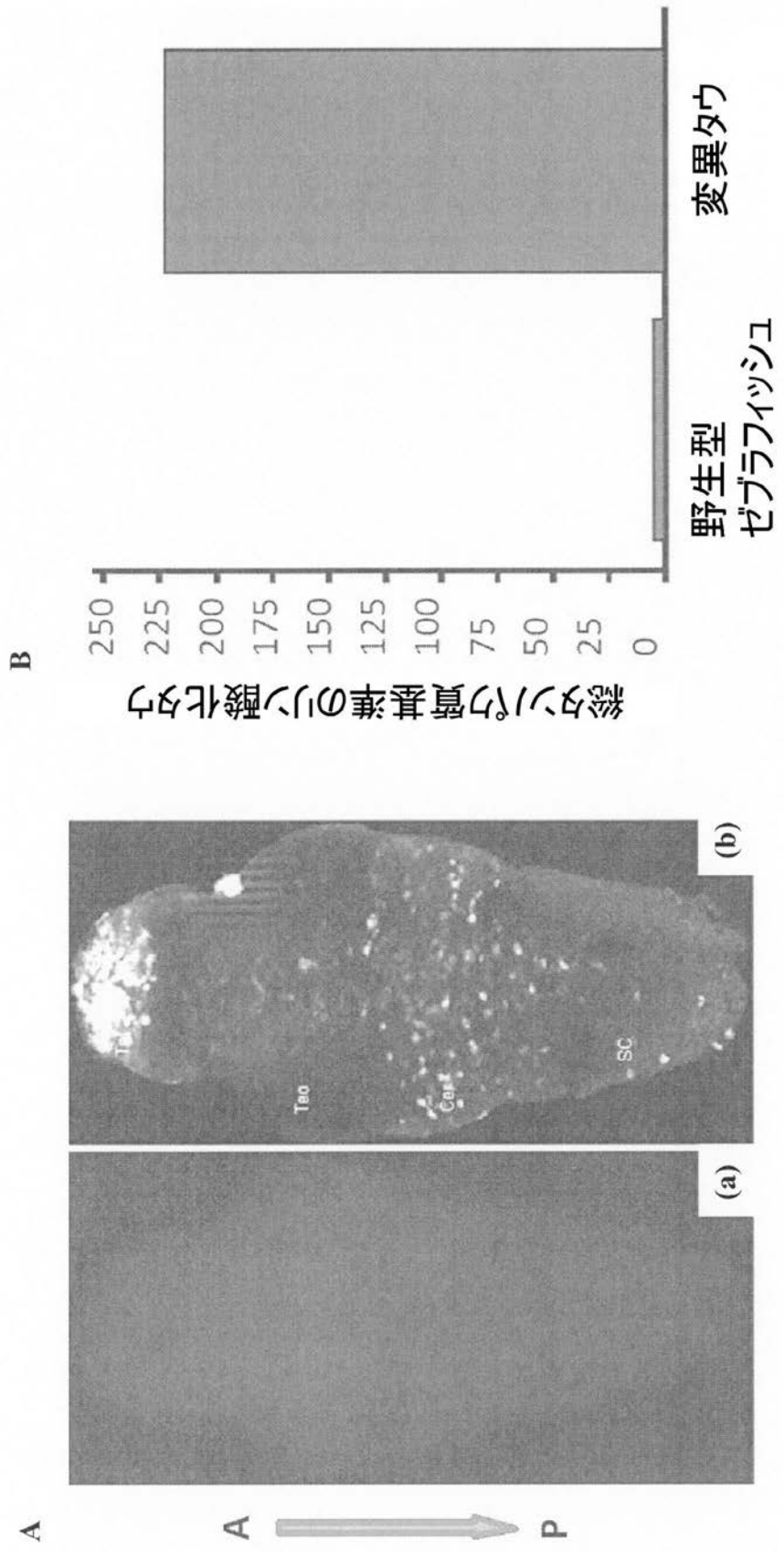
E



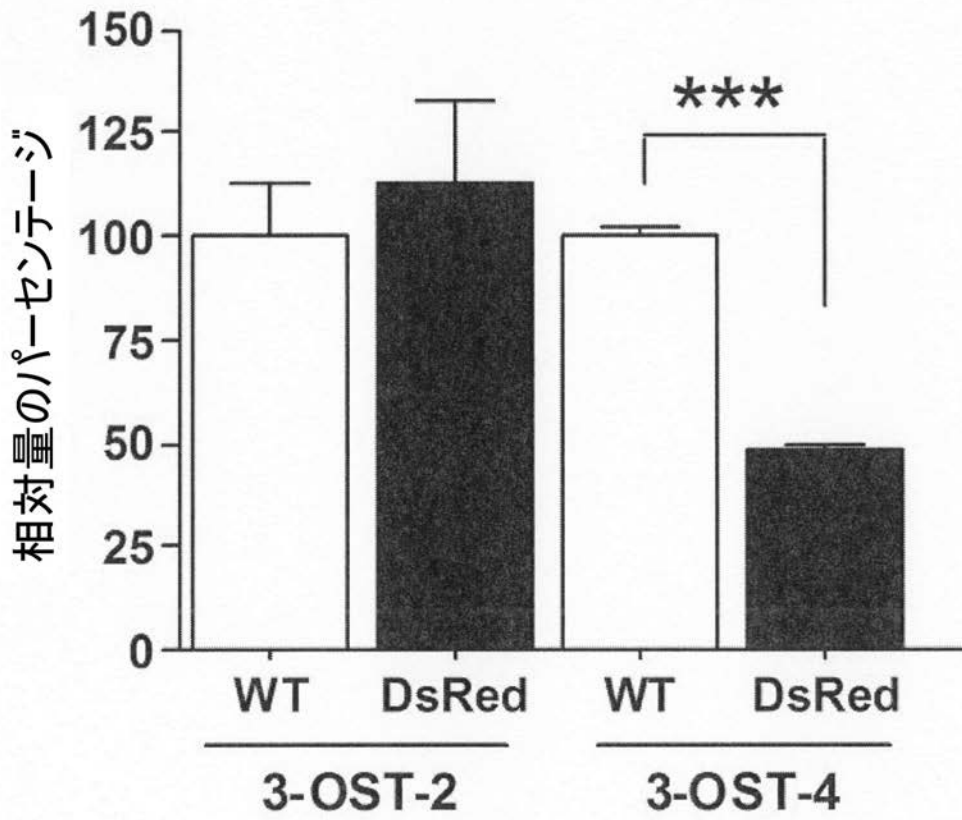
【 図 9 】



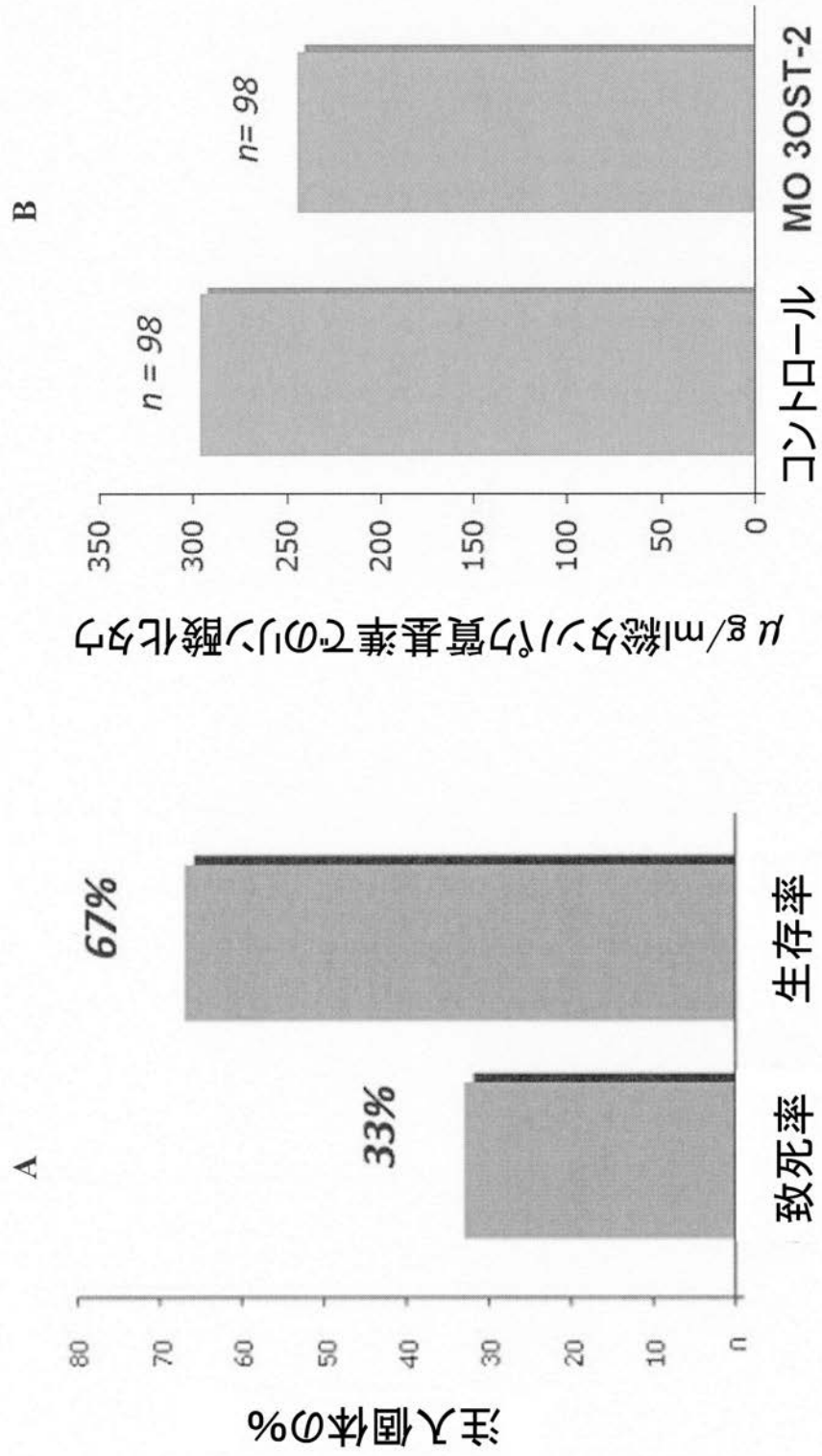
【図10】



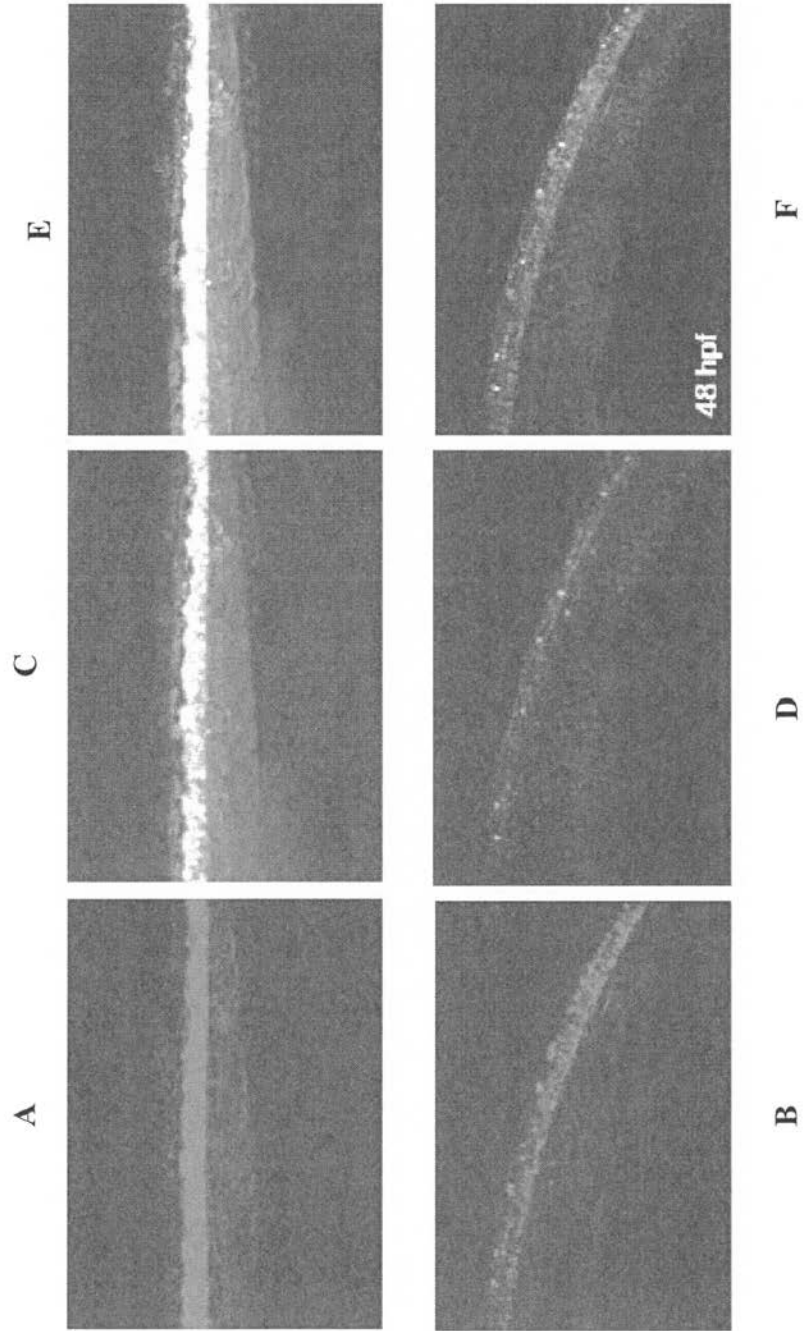
【図 1 1】



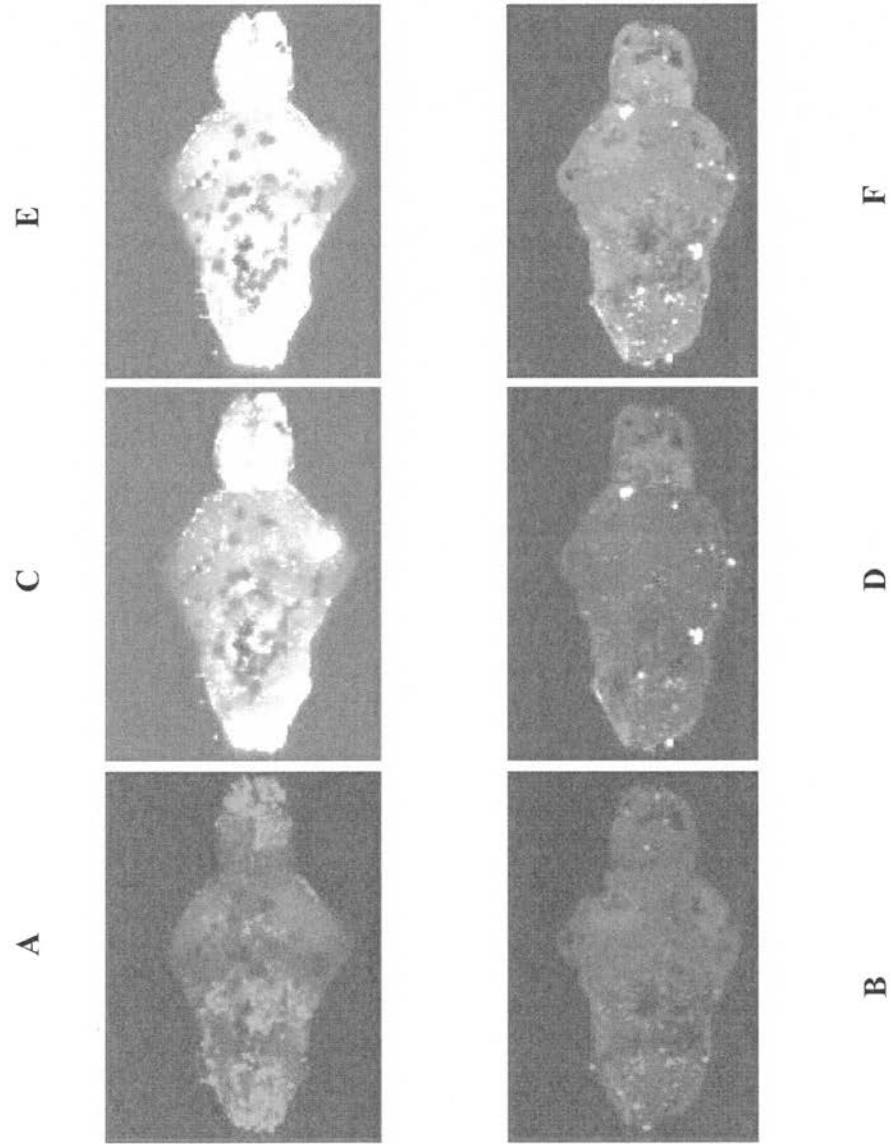
【 図 1 2 】



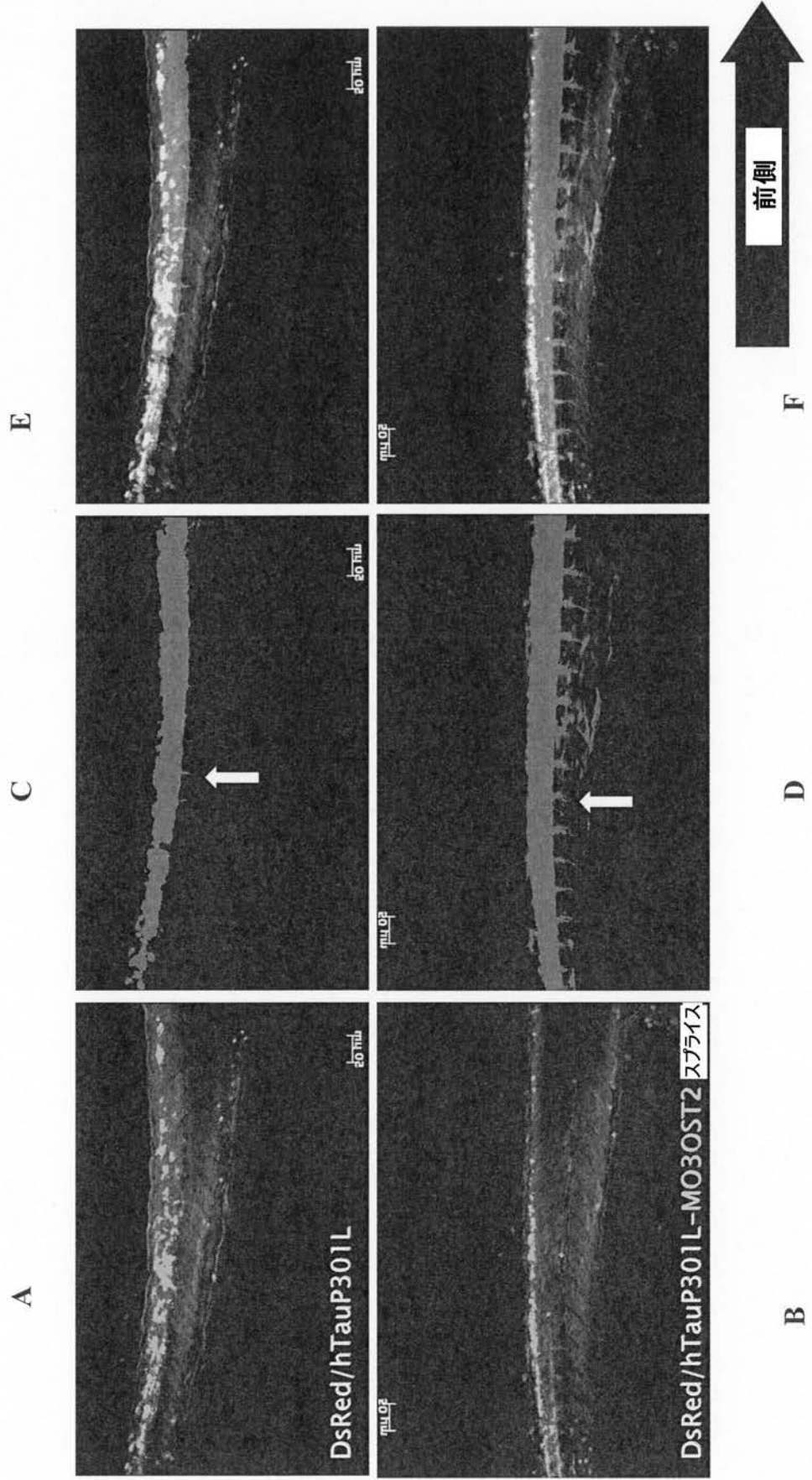
【 図 1 3 】



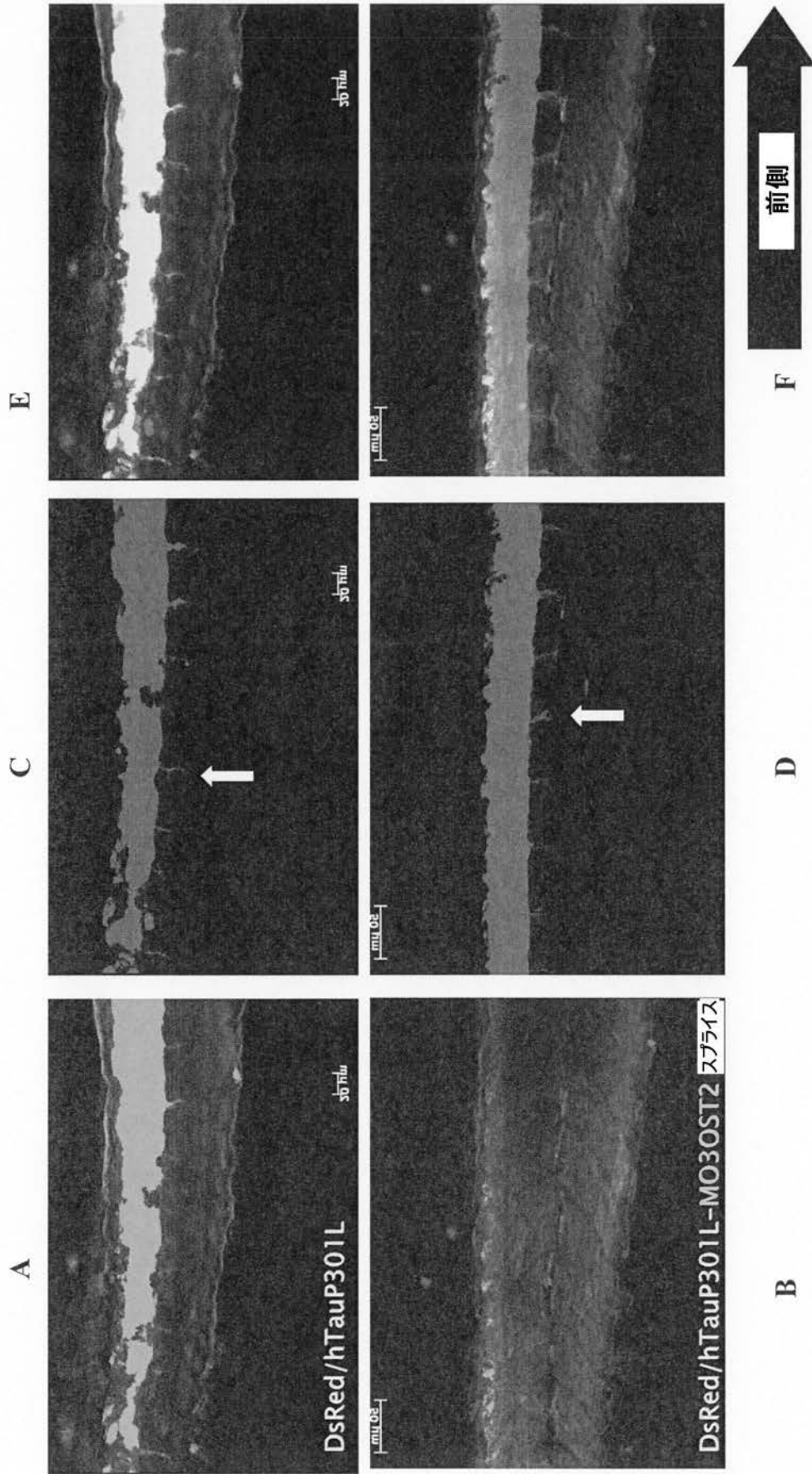
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

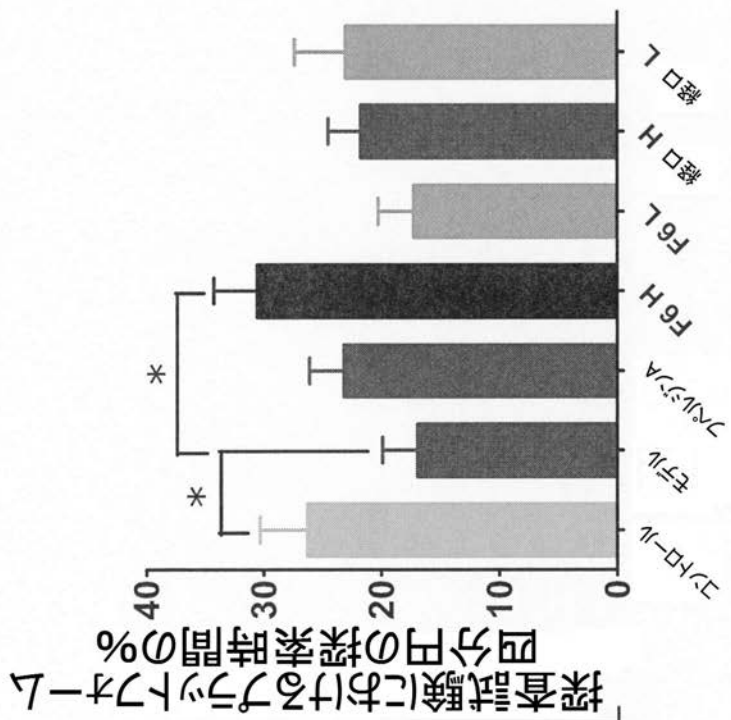


【 図 16 】

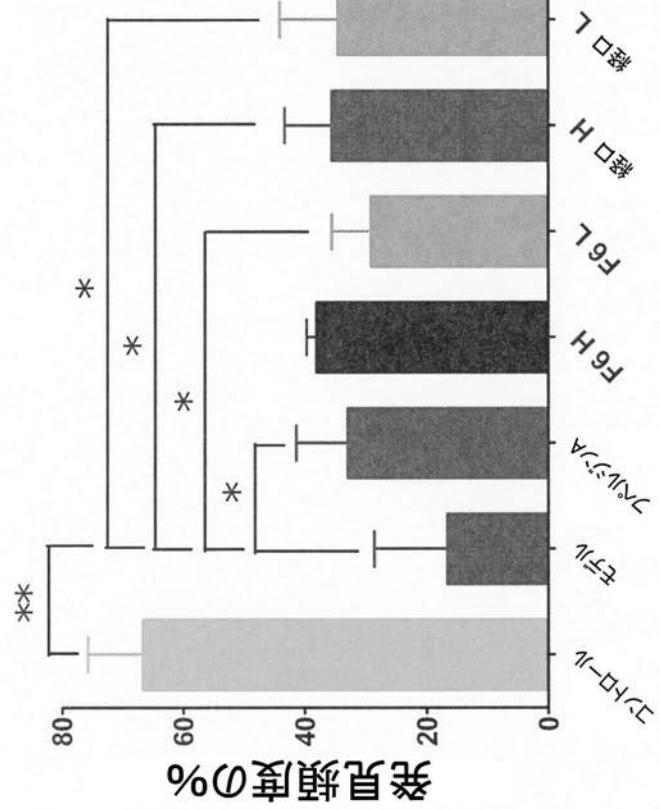


【図 17】

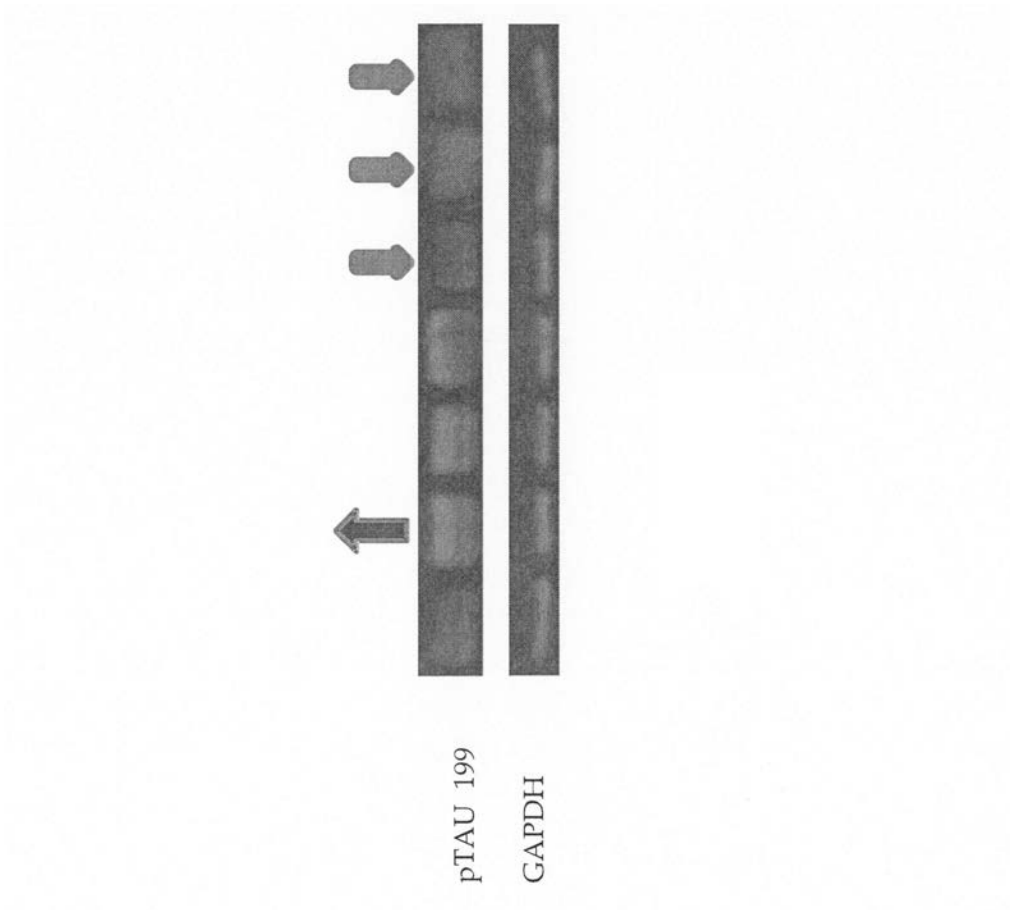
B



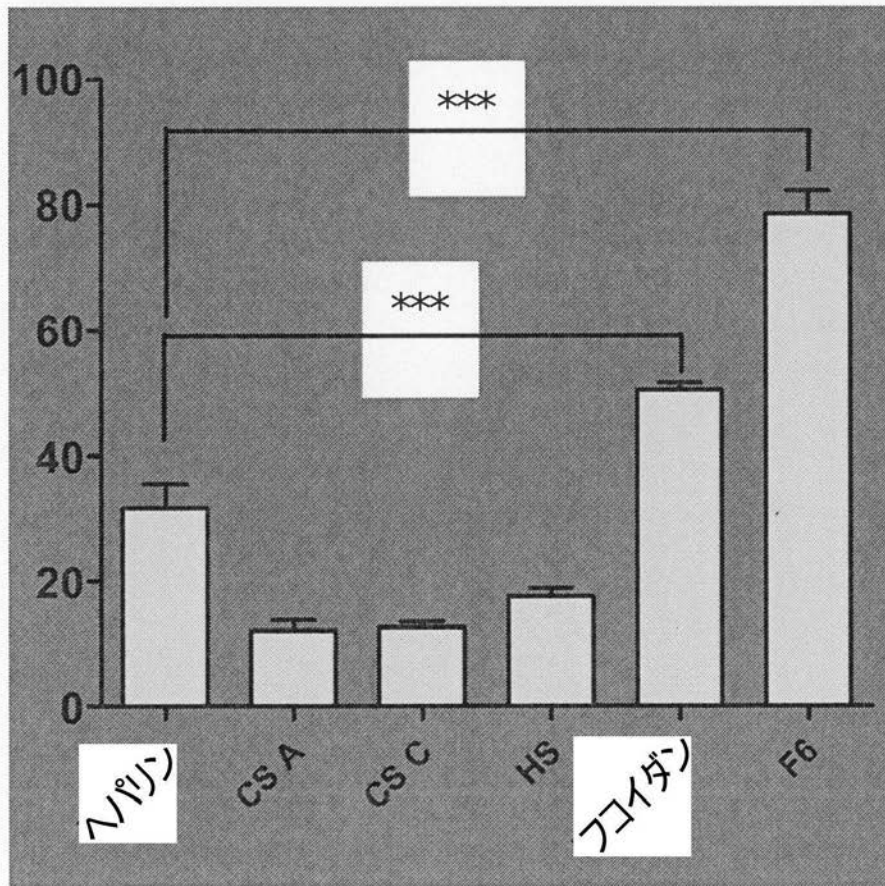
A



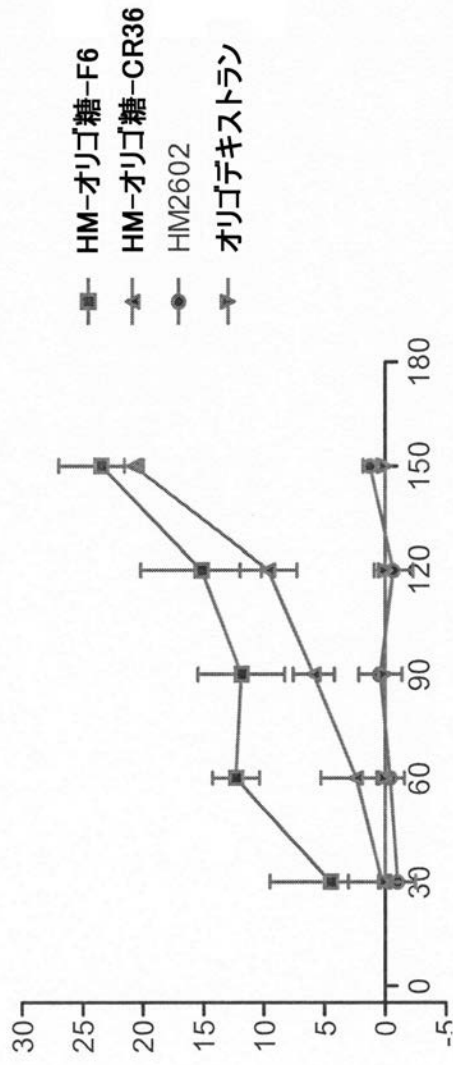
【 図 1 8 】



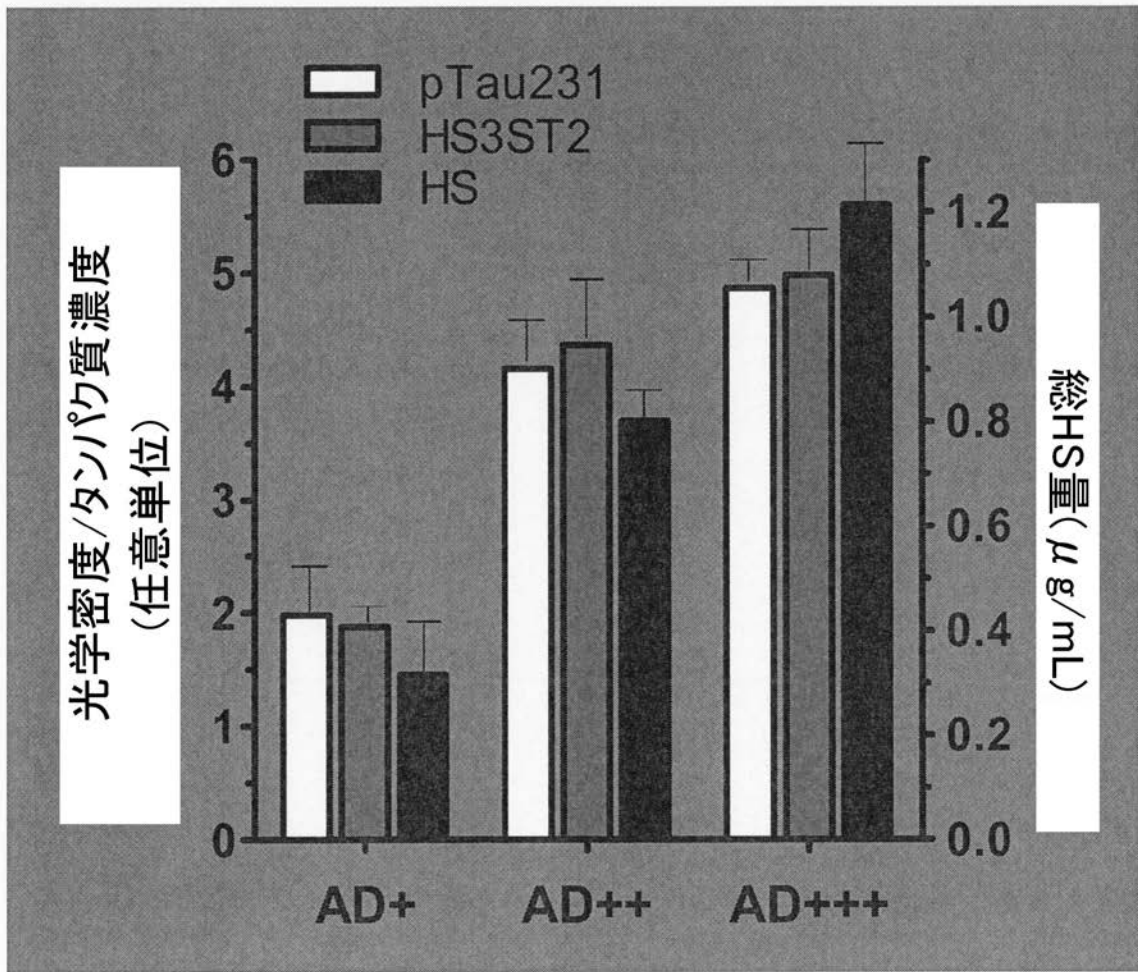
【 図 2 0 】



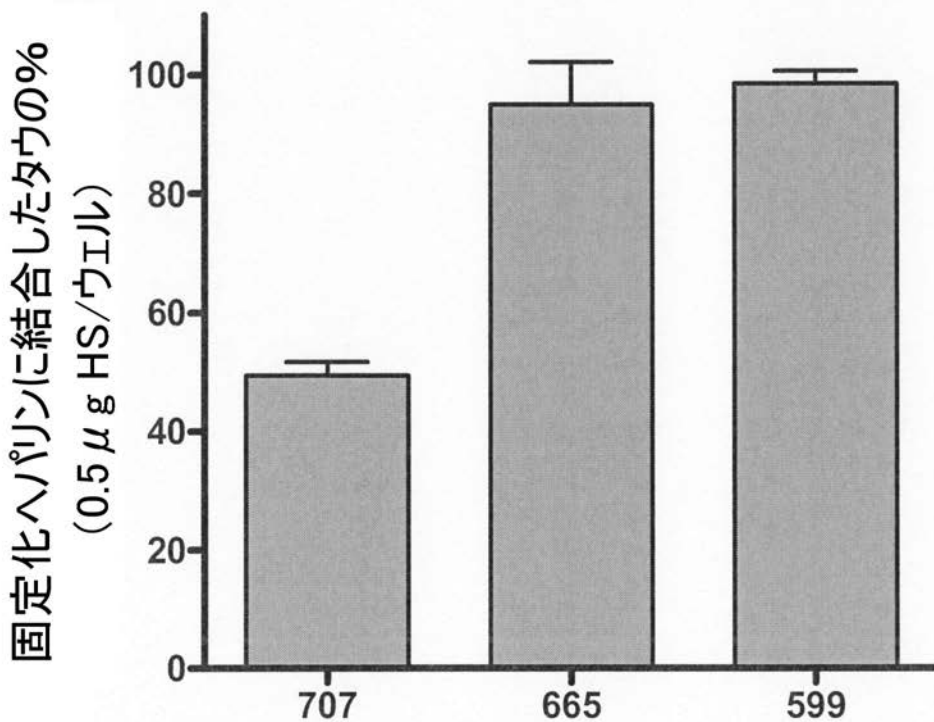
【 図 2 1 】



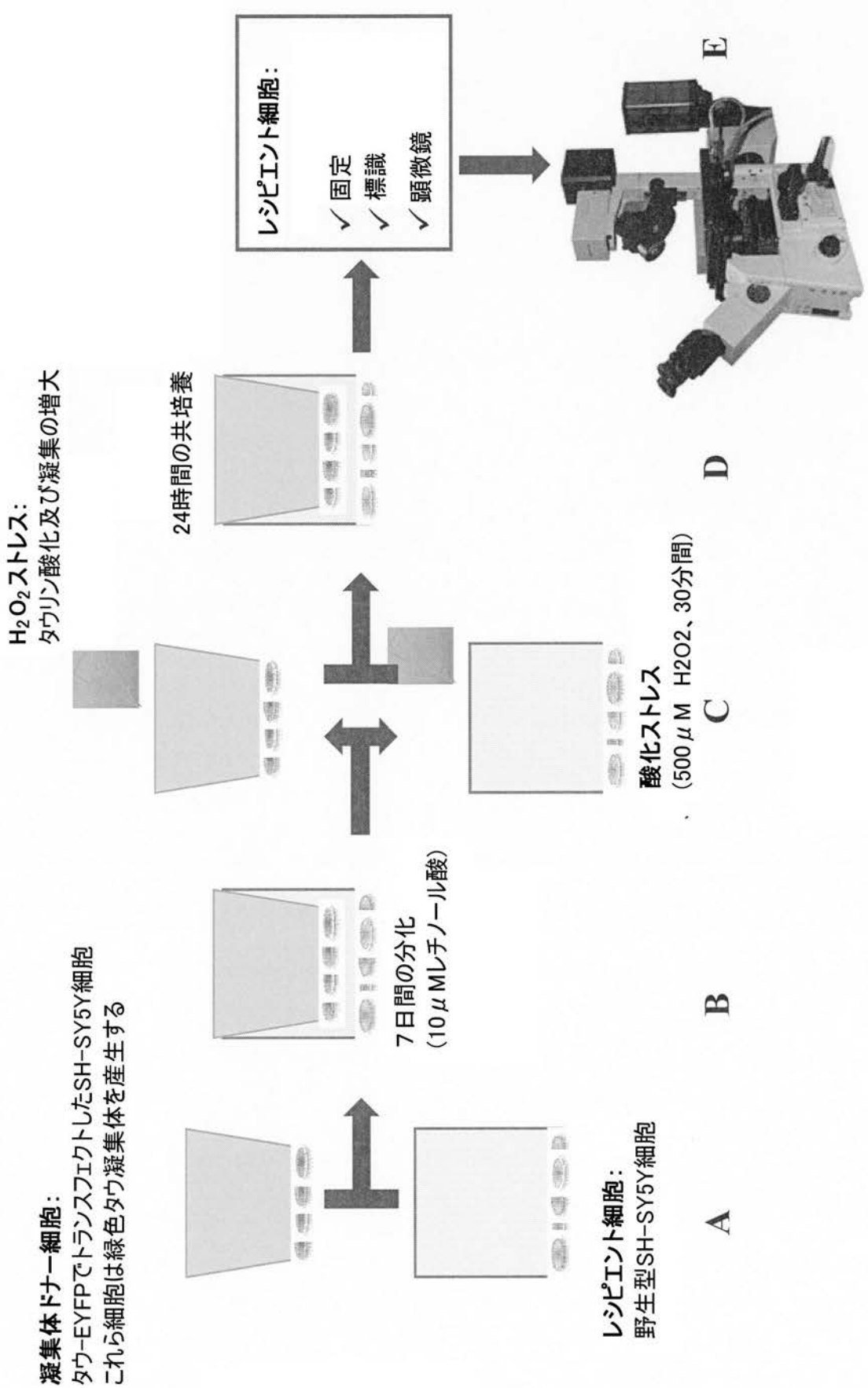
【 図 2 2 】



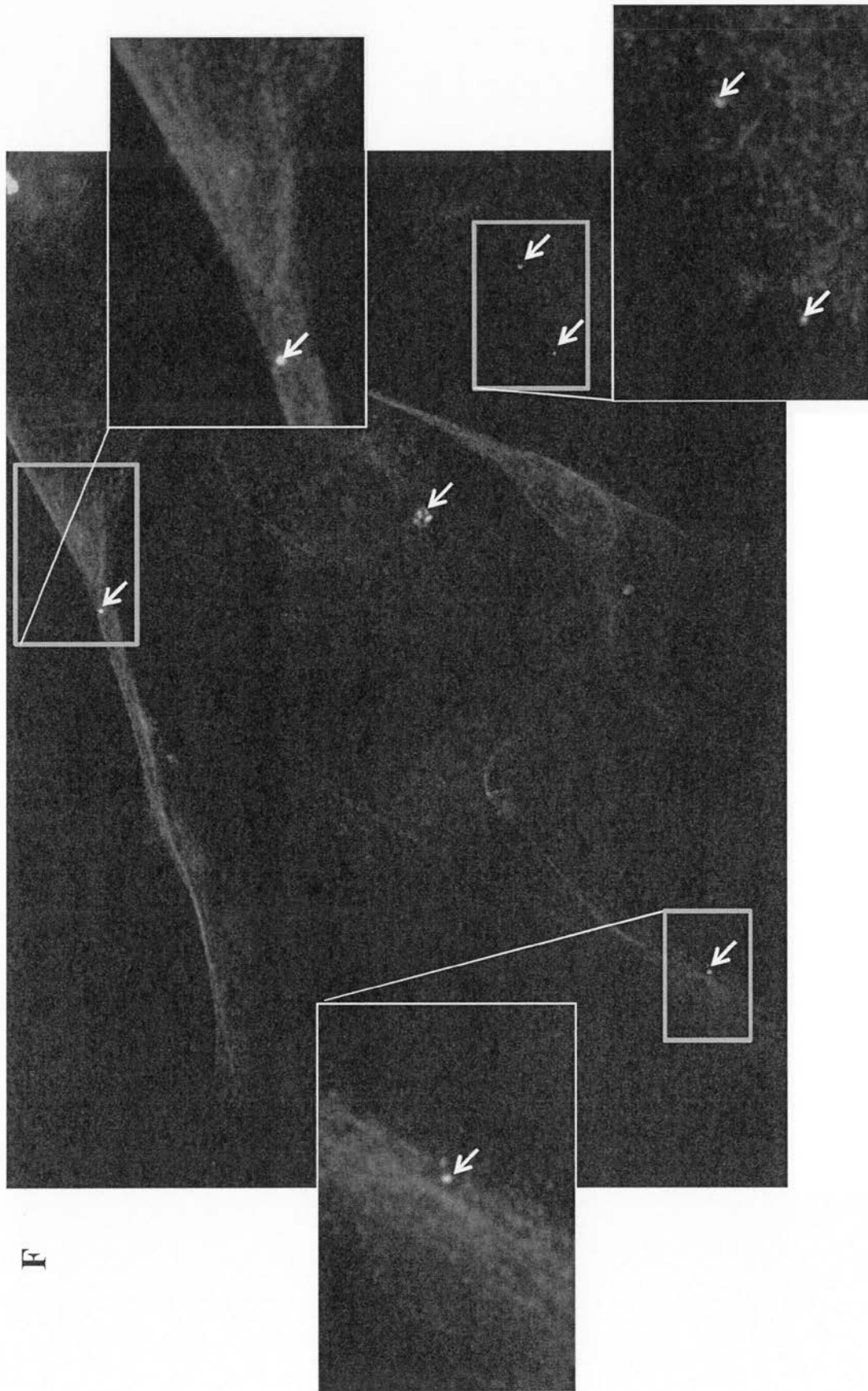
【 図 2 3 】



【 図 2 4 - 1 】



【 図 2 4 - 2 】



F

【 図 2 4 - 3 】

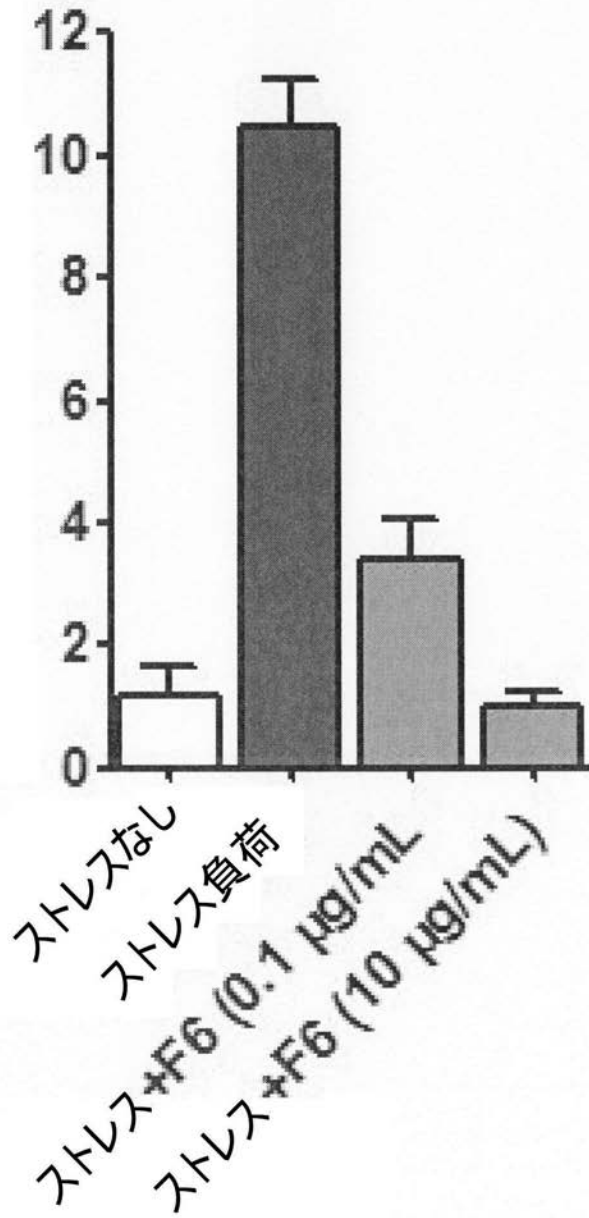


G

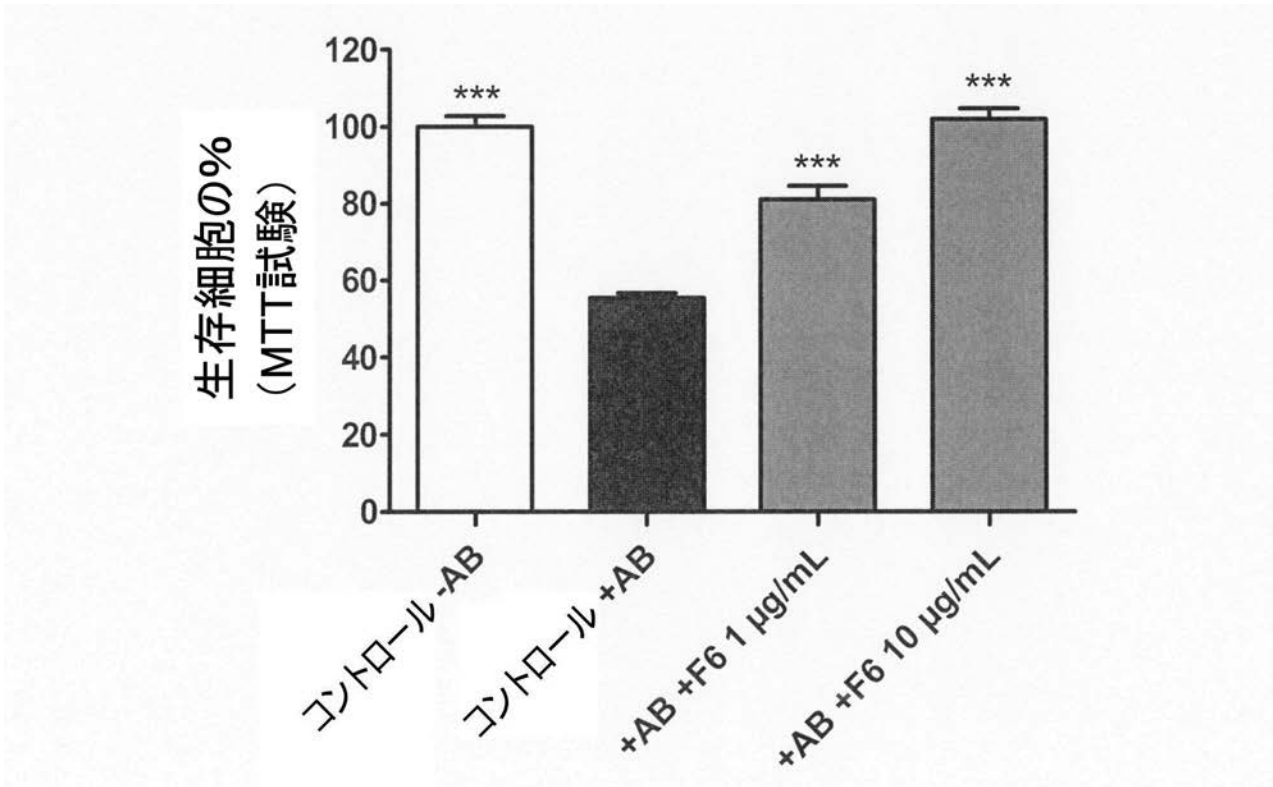
【図 24 - 4】

H

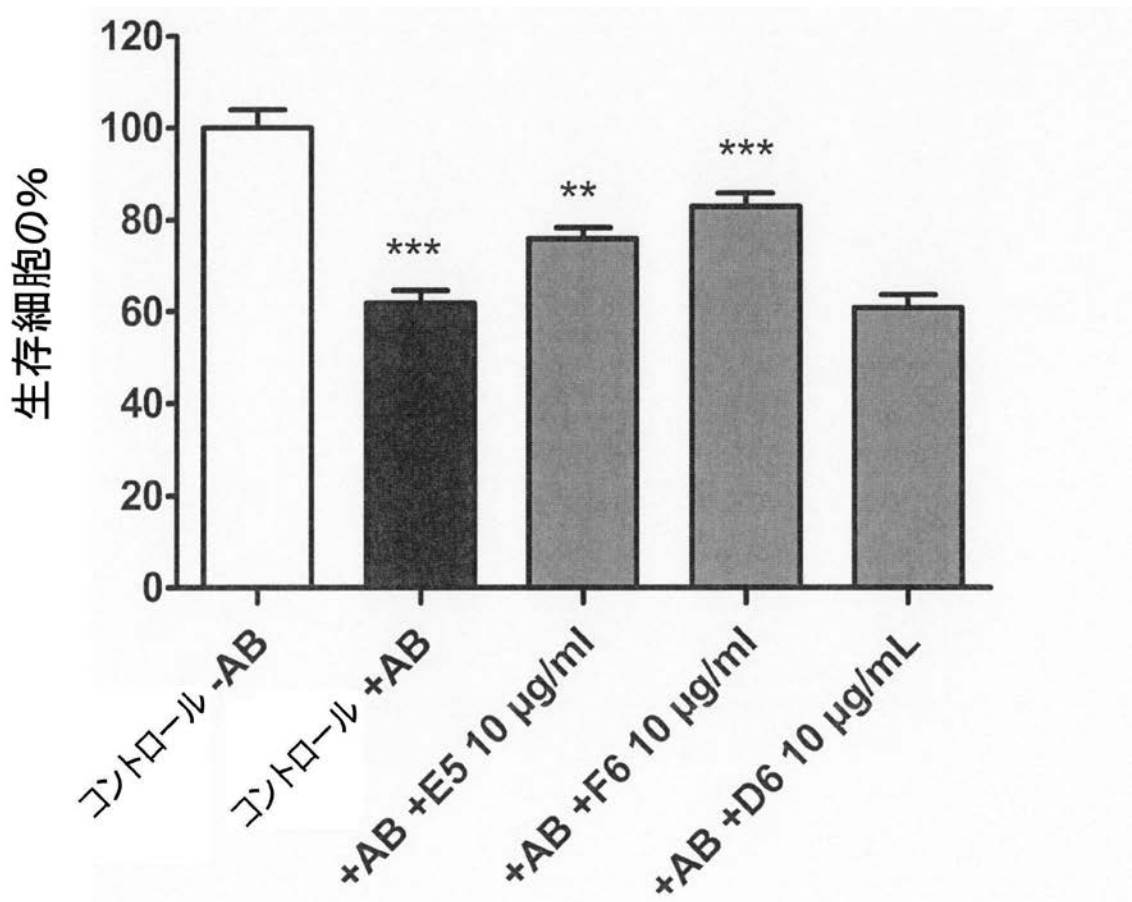
蛍光タグ凝集体の数/視野



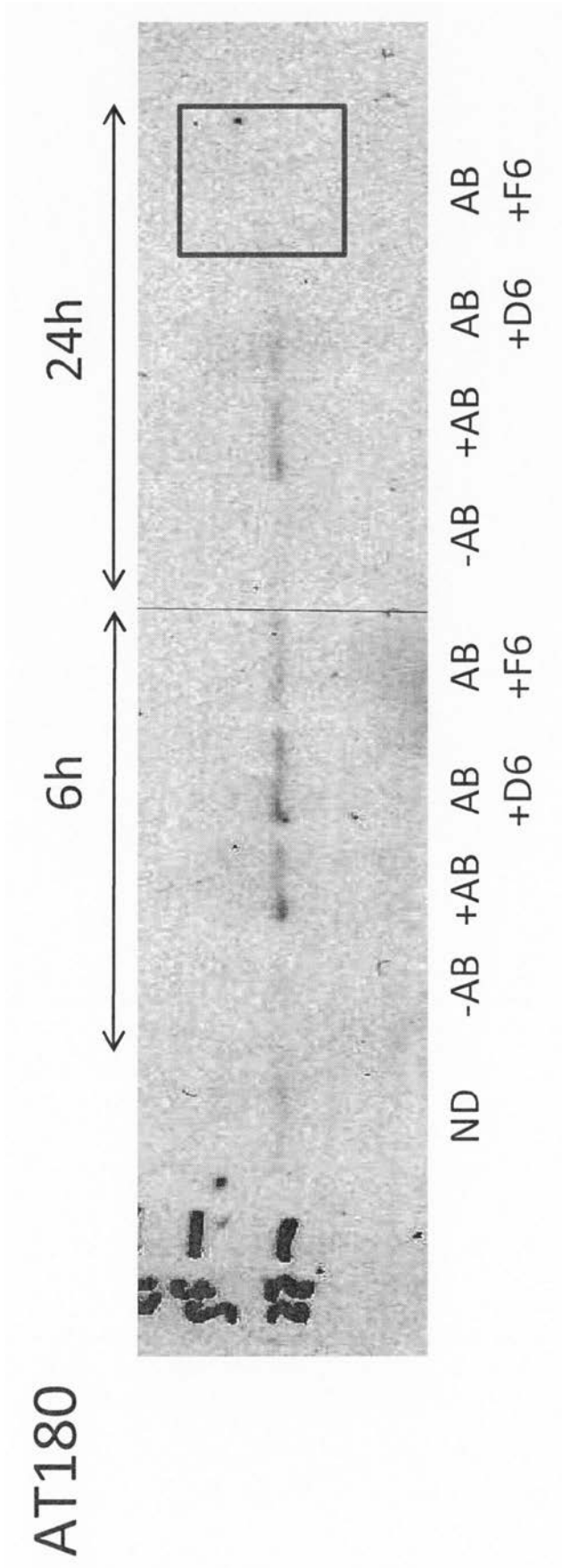
【 図 2 5 】



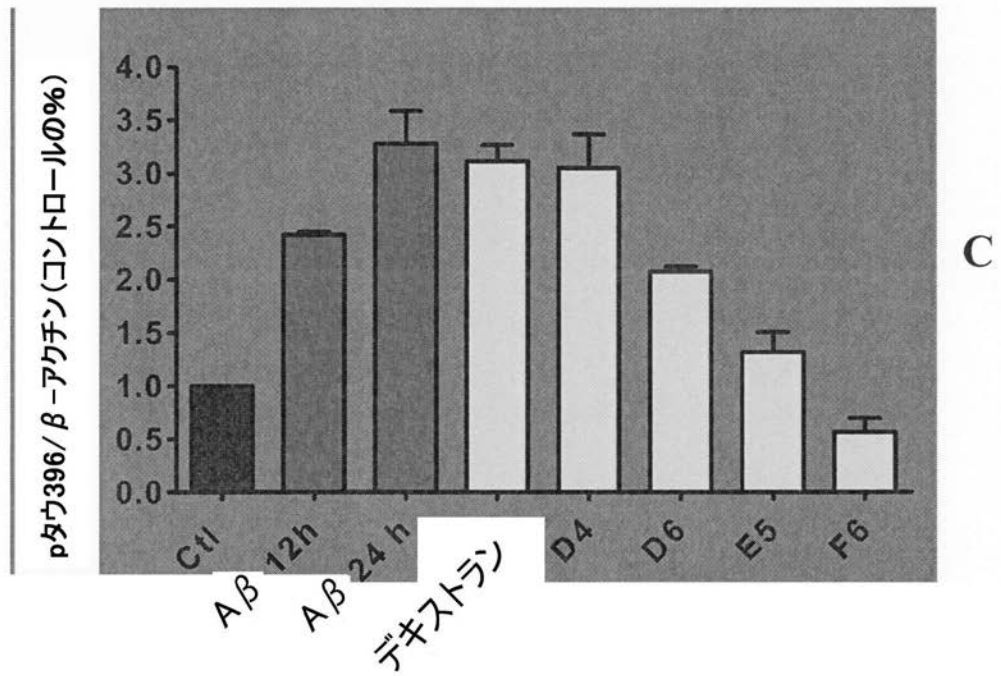
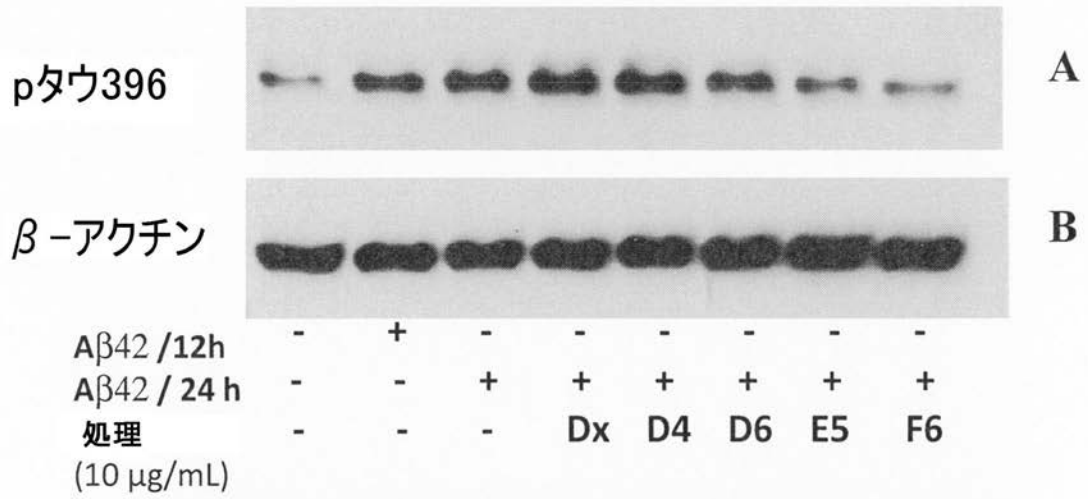
【 図 2 6 】



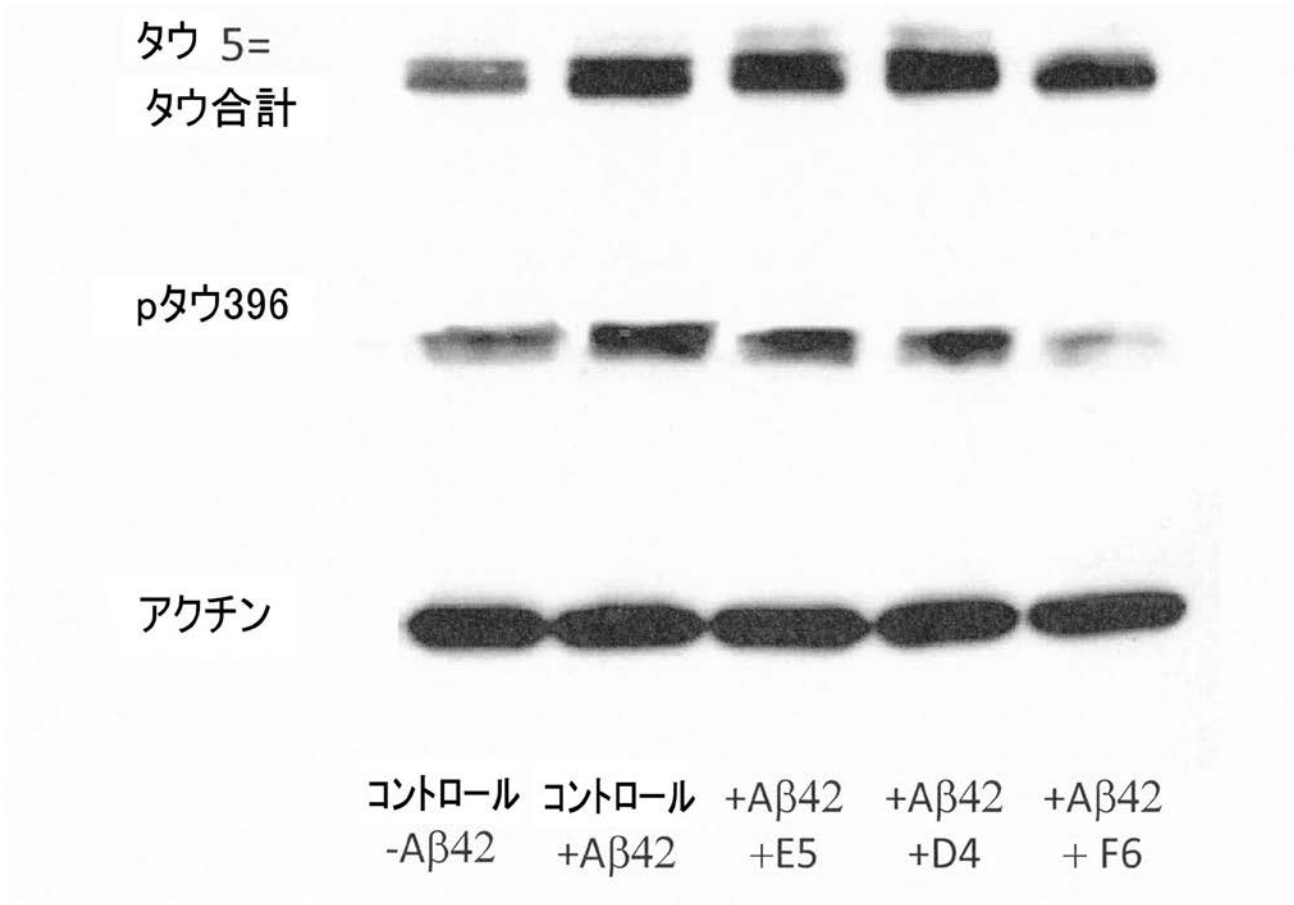
【 図 27 】



【 図 2 8 】



【 図 2 9 】



【 配 列 表 】

[2015502332000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/070435

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12Q1/68	A61K31/713	A61K31/737
C12N15/113	A61K31/70	A61P25/28
ADD.		
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) C12Q A61K G01N C12N		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/69444 A1 (CORNELLI UMBERTO [IT]; AMBROSI LUIGI DE [IT]; HANIN ISRAEL [US]; FAREE) 23 November 2000 (2000-11-23) claims 2,4,8	1,2
X	----- LAWRENCE ET AL: "The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues", MATRIX BIOLOGY, ELSEVIER, NL, vol. 26, no. 6, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 442-455, XP022165318, ISSN: 0945-053X, DOI: 10.1016/J.MATBIO.2007.03.002 page 452, left-hand column, last paragraph ----- -/--	17
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 17 January 2013		Date of mailing of the international search report 31/01/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ulbrecht, Matthias

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/070435

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KOICHI ISHIGURO ET AL: "Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease", NEUROSCIENCE LETTERS, vol. 270, no. 2, 1 July 1999 (1999-07-01), pages 91-94, XP055036079, ISSN: 0304-3940, DOI: 10.1016/S0304-3940(99)00476-0 the whole document</p> <p>-----</p>	3-16,19, 20
X	<p>HAMPEL H ET AL: "Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease", EXPERIMENTAL GERONTOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 45, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 30-40, XP026808949, ISSN: 0531-5565 [retrieved on 2009-10-22] the whole document</p> <p>-----</p>	3-16,19, 20
X	<p>PAQUET DOMINIK ET AL: "A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 119, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 1382-1395, XP008152421, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JC137537 [retrieved on 2009-02-13] the whole document</p> <p>-----</p>	19,20
A	<p>GOEDERT M ET AL: "Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans", NATURE: INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 383, no. 6600, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 550-553, XP009141830, ISSN: 0028-0836 the whole document</p> <p>-----</p>	1-18
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/070435

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GANDHI N S ET AL: "Heparin/heparan sulphate-based drugs", DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 15, no. 23-24, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 1058-1069, XP027533542, ISSN: 1359-6446 [retrieved on 2010-11-27] page 1063, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 -----</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/070435**Box No. 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:
2. Claims Nos.: **1, 2(partially)**
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 No. 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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2012/ 070435

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1, 2(partially)

1. Claim 1 refers to agents merely defined by their intended properties of affecting directly or indirectly the activity and/or level of the molecules recited under a) - h). It is indeterminable which agents are covered by this definition, in particular since the agents' effects may also be indirect (Art. 6 PCT). Further unclarity arises since the activities of heparan sulfate, tau and phosphorylated tau are not defined. In conclusion, no meaningful search of the entire scope of claim 1 can be performed. The only instances of agents possibly falling under the scope of claim 1 which can be derived from the application are those defined in claim 2(a), siRNA or morpholino antisense oligonucleotides targeting 3-OST-2 or 3-OST-4, and protamine or protamine sulfate. Consequently, the search of claim 1 has been limited to these agents. 2. The considerations under item 1. herein above apply mutatis mutandis to claim 2, inasmuch as it refers to an oligonucleotide in general, a small molecule and an inhibitor of heparin and heparan sulfate actions (Art. 6 PCT). Thus, the same limitation of search has been applied to this claim.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/070435

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0069444	A1	23-11-2000	
		AT 288761 T	15-02-2005
		AU 764743 B2	28-08-2003
		AU 4405200 A	05-12-2000
		CA 2373975 A1	23-11-2000
		CN 1350459 A	22-05-2002
		CZ 20014092 A3	17-04-2002
		DE 60018061 D1	17-03-2005
		DE 60018061 T2	13-04-2006
		DK 1181024 T3	13-06-2005
		EP 1181024 A1	27-02-2002
		ES 2237425 T3	01-08-2005
		HK 1039903 A1	26-08-2005
		HU 0201100 A2	29-07-2002
		IT MI991066 A1	14-11-2000
		JP 2002544233 A	24-12-2002
		NO 20015544 A	14-01-2002
		PL 352070 A1	28-07-2003
		PT 1181024 E	30-06-2005
		US 6979680 B1	27-12-2005
		WO 0069444 A1	23-11-2000
		ZA 200109331 A	28-08-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
A 6 1 K	38/45 (2006.01)	A 6 1 K	37/52	
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	37/08	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	31/737 (2006.01)	A 6 1 K	31/737	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 K	31/702 (2006.01)	A 6 1 K	31/702	
A 6 1 K	31/715 (2006.01)	A 6 1 K	31/715	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	S
C 0 7 K	16/40 (2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 0 1 A
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/40	
		C 0 7 K	16/18	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(71)出願人 514092146

ユニベルシテ パリ - エスト クレティユ ヴァル ド マルヌ
UNIVERSITE PARIS - EST CRETEIL VAL DE MARNE
フランス、エフ - 9 4 0 1 0 クレティユ セデックス、アベニュー デュ ジェネラル ド ゴー
ル、6 1
6 1 , avenue du General de Gaulle , F - 9 4 0 1 0 Cre
te il Cedex , France

(71)出願人 509017424

ユニベルシテ ピエール エ マリー キュリー (パリ 6)
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)
フランス、エフ - 7 5 2 5 2 パリ セデックス 05、プラス ジュシュー 4
4 , place Jussieu , F - 7 5 2 5 2 Paris Cedex 05 , Fr
ance

(71)出願人 514092157

アイシーエム - アンスティテュ デュ セルヴォ エ ド ラ モワル エピニエール
ICM - INSTITUT DU CERVEAU ET DE LA MOELLE EPIN
IERE
フランス、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、ブールバール ド オピタル、4 7 / 8 3、オピタル ピテ
ィエ サルペートリエール
Hopital Pitie Salpetriere , 4 7 / 8 3 , boulevard
de l 'Hopital , F - 7 5 0 1 3 Paris , France

(71)出願人 514092168

オーティーアール 3
O T R 3

- フランス、エフ - 75001 パリ、リュ フランソワーズ、4
4, rue Françoise, F-75001 Paris, France
- (71)出願人 500257447
アシスタンス ピュブリック - オピト ド パリ
ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS
フランス、エフ - 75004 パリ、アベニュー ビクトリア 3
3, avenue Victoria, F-75004 Paris, FRANCE
- (74)代理人 100065248
弁理士 野河 信太郎
- (74)代理人 100159385
弁理士 甲斐 伸二
- (74)代理人 100163407
弁理士 金子 裕輔
- (74)代理人 100166936
弁理士 稲本 潔
- (74)代理人 100174883
弁理士 富田 雅己
- (72)発明者 パピー - ガルシア, ドゥルセ
フランス、エフ - 91380 チリー マザラン、リュ パストゥール、3
- (72)発明者 ウィン, ミン バオ
フランス、エフ - 94400 ヴィトリー シュル セーヌ、パティマン シー . イー 173、リ
ュ レイク サティ、16
- (72)発明者 スシー - ヤニコスタス, ナディア
フランス、エフ - 75011 パリ、ヴィラ ゴドレ、9
- (72)発明者 ヴォザリ, リタ
フランス、エフ - 75013 パリ、リュ ドンレミー、62
- (72)発明者 シネリス, フェルナンド
フランス、エフ - 78180 モンティニー レ ブルトンヌー、アレ デ ロマラン、5
- (72)発明者 ヤニコスタス, コンスタンティン
フランス、エフ - 75011 パリ、ヴィラ ゴドレ、9
- Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA10 CA12 DA03 HA14 HA17
4B063 QA13 QA19 QQ02 QQ03 QQ27 QQ53 QQ79 QR07 QR36 QR48
QR62 QR72 QS02 QS25 QS33 QS34 QX01
4C084 AA13 AA17 DC25 DC50 NA14 ZA152 ZA162 ZB212 ZB262
4C086 AA01 AA02 EA01 EA16 EA20 EA26 EA27 EA28 MA01 MA04
NA14 ZA15 ZA16 ZC02
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA21 EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015502332A5	公开(公告)日	2015-09-10
申请号	JP2014535120	申请日	2012-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心 UNI-贝尔引用巴黎东克雷泰伊马恩瓦尔 UNIV PARIS CRETEIL IS瓦勒德马恩省 UNIV PIERRE & 玛丽居里 - 巴黎6 UPMC 智能Mアンスティテュデュセルヴォエドラモワルエピニエール ICM INST杜CERVEAU & DE LA MOELLE EPINIERE 哦茶伯爵3 OTR3		
申请(专利权)人(译)	中心法国国家Shiantifiku Yuniberushite巴黎 - 东克雷泰伊马恩河谷省 ユニベルシテ皮埃尔工玛莉居里 (6) 巴黎 艾GCM - 杜研究所等Servoz德拉Mowaru Epinieru 哦茶伯爵3 芦苇的立场ピュブリック-オピト德巴黎		
[标]发明人	パピーガルシアドウルセ ウインミンバオ スシーヤニコスタスナディア ヴォザリリタ シネリスフェルナンド ヤニコスタスコンスタンティン		
发明人	パピー-ガルシア,ドウルセ ウィン,ミン バオ スシー-ヤニコスタス,ナディア ヴォザリ,リタ シネリス,フェルナンド ヤニコスタス,コンスタンティン		
IPC分类号	A61K45/00 A61K31/727 C12Q1/04 C12Q1/68 C12Q1/48 C12N15/09 A61K38/45 A61K38/16 A61K48/00 A61K31/713 A61K31/737 A61P25/28 A61K31/702 A61K31/715 G01N33/53 G01N33/543 C07K16/40 C07K16/18		
CPC分类号	A61K31/713 A61K31/721 A61K31/727 A61K31/737 A61K38/1703 A61P25/28 A61K31/70 A61K38/1709 C12N15/1137 C12N2310/14 C12Q1/6886 C12Q2600/158 C12Y208/02023 C12Y208/02029 C12N2310/3233 C12N2320/30 C12Q1/686 C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/136 G01N33/5308 G01N33/6896 G01N2333/47 G01N2333/91194 G01N2440/14 G01N2500/20 G01N2800/28 G01N2800/2821 G01N2800/52		
FI分类号	A61K45/00 A61K31/727.ZNA C12Q1/04 C12Q1/68.A C12Q1/48.Z C12N15/00.A A61K37/52 A61K37/08 A61K48/00 A61K31/713 A61K31/737 A61P25/28 A61K31/702 A61K31/715 G01N33/53.D G01N33/53.S G01N33/543.501.A C07K16/40 C07K16/18		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ27 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR07 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QS02 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/DC25 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA01 4C086/EA16 4C086		

/EA20 4C086/EA26 4C086/EA27 4C086/EA28 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA15
4C086/ZA16 4C086/ZC02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045
/EA50

代理人(译) 清稻本润一
富田雅美

优先权 61/547226 2011-10-14 US
2012305414 2012-04-06 EP

其他公开文献 JP2015502332A
JP6336909B2

摘要(译)

技术领域本发明涉及神经变性疾病，特别是阿尔茨海默病的诊断，预后
预测或治疗。【选择图】无