

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報(A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 529769

(P2003 - 529769A)

(43)公表日 平成15年10月7日(2003.10.7)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド [*] (参考)
G 0 1 N 33/53	ZNA	G 0 1 N 33/53	ZNA Y 2 G 0 4 5 D 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02		1/68	A
1/68		G 0 1 N 33/48	P

審査請求 未請求 予備審査請求(全 43数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 572877(P2001 - 572877)

(86)(22)出願日 平成13年3月30日(2001.3.30)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月30日(2002.9.30)

(86)国際出願番号 PCT/GB01/01442

(87)国際公開番号 W001/075452

(87)国際公開日 平成13年10月11日(2001.10.11)

(31)優先権主張番号 0007778.4

(32)優先日 平成12年3月30日(2000.3.30)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 キングス カレッジ ロンドン
イギリス ロンドン ダブリュシー2アール
2エルエス アン インスティテュート
インコーポレイテッド バイ ロイヤル
チャーター オブ ストランド

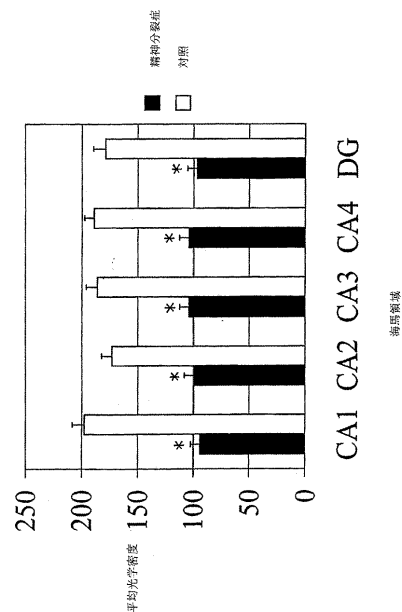
(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経組織の損傷の検出

(57)【要約】

本発明は、神経毒性学および神経病理学の分野での診断に関し、より詳細には、神経組織に対する損傷の領域を可視化することに関する。詳細には、本発明は、神経学的損傷のマーカーとしてSCIPを使用することに関する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 神経細胞および/または神経組織中のSCIP遺伝子の発現についてアッセイすることを含む、神経の損傷を検出する方法。

【請求項2】 SCIPタンパク質の存在についてアッセイすることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 SCIPタンパク質の存在を検出するために免疫組織化学的アッセイを使用する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 被験体から神経細胞および/または神経組織のサンプルを得ること、ならびに、SCIPタンパク質が存在するかどうかを決定するために、該神経細胞および/または神経組織を、SCIPタンパク質に対して親和性を有している抗体分子と接触させることを含む、請求項2または請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記抗体分子は、モノクローナル抗体である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記抗体分子は、標識されている、請求項4または請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記抗体分子は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、または放射性同位元素で標識されている、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記抗体分子は、SCIPタンパク質に対して親和性を有する抗体分子に対して親和性を有しており、かつ標識されている抗体分子によって検出される、請求項4または請求項5に記載の方法。

【請求項9】 SCIP mRNAの存在をアッセイすることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 SCIP mRNAの存在を検出するためにインサイチュアハイブリダイゼーションアッセイを使用する、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 被験体からの神経細胞および/または神経組織のサンプルを得ること、および前記神経組織をSCIP mRNAを特異的に認識するプローブと接触させることを含む、請求項9または請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記プローブは、標識されている、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記プローブは、ジゴキシゲニンで標識されている、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記プローブは、核酸プローブである、請求項11～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】 前記核酸プローブは、DNAプローブまたはRNAプローブである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記プローブは、約10～500ヌクレオチド長である、請求項14または15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】 前記プローブは、前記SCIP mRNAの少なくとも一部の配列に対応する配列を有する、請求項14～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】 前記プローブの前記配列は、前記SCIP mRNAに固有の一部であって、前記SCIP mRNAの任意の一部に対応する、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 前記プローブの前記配列は、前記SCIP mRNAの一部であって、前記SCIPタンパク質のN末端領域をコードする部分に対応する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 SCIPタンパク質に対して親和性を有する第1の抗体分子、該第1の抗体分子に対して親和性を有する第2の標識された抗体分子、前記第2の抗体分子の標識との組み合わせにより着色反応を発生する展開剤、適切な緩衝希釈剤、ならびに神経細胞および/または神経組織を染色し、前記第1の抗体分子および第2の抗体分子を使用して標識された物質を含んでいるSCIPとの対比をするための対比染色を含む、神経細胞および/または神経組織においてSCIPを検出するためのキット。

【請求項21】 ネガティブおよび/またはポジティブな結果を得るために、1つまたは複数の成分をさらに含む、請求項20に記載のキット。

【請求項22】 インサイチュールハイブリダイゼーション(ISH)によっ

て、神経細胞および/または神経組織におけるSCIPの発現を検出するためのキットであって、該キットは、SCIP mRNAに対して相補的な配列をコードしており、かつ標識されている核酸プローブ、プレインキュベーションステップおよびインキュベーションステップのための緩衝溶液、前記標識されている核酸プローブに対して親和性を有しており、かつ標識されている抗体分子、該標識されている抗体分子との接触により着色反応を発生する展開剤、適切な緩衝希釈剤、ならびに、神経細胞および/または神経組織を染色し、前記標識されている核酸プローブおよび抗体分子を使用して標識された物質を含んでいるSCIPとの対比をするための対比染色を含むキット。

【請求項23】 ネガティブおよび/またはポジティブな結果を得るために、1つまたは複数の成分をさらに含む、請求項22に記載のキット。

【請求項24】 請求項1～19のいずれか一項に記載の方法を使用して、または請求項20～23のいずれか一項に記載のキットを使用して、被験体の細胞中におけるSCIPの発現レベルの増大についてアッセイすることを含む、被験体の精神分裂症を検出するための方法。

【請求項25】 神経細胞および/または神経組織を試験化合物と接触させること、ならびに神経細胞および/または神経組織中でのSCIPの発現についてアッセイすることを含む、試験化合物の神経毒性をアッセイするための方法。

【請求項26】 前記神経細胞および/または神経組織は、インビトロで前記試験化合物と接触させられる、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記神経細胞および/または神経組織は、インビボで前記試験化合物と接触させられる、請求項25に記載の方法。

【請求項28】 前記試験化合物は、動物に投与される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 前記神経細胞および/または神経組織中でのSCIPの発現レベルの増大は、前記試験化合物の神経毒性を示す、請求項25～28のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、神経毒性学および神経病理学の分野での診断に関し、そしてより詳細には、神経細胞および/または神経組織の損傷の領域を可視化することに関する。

【0002】

神経細胞および/または神経組織に対する損傷の検出は、薬物の毒性について試験する（すなわち、薬物の神経毒性を決定する）場合に、および神経病理学の存在を決定する場合に、重要である。

【0003】

薬物の毒性試験においては、試験化合物が中枢神経系に対して何らかの有害な影響を及ぼすかどうかを決定することが必要である。この決定は、いくつかの構成部分を有する：第1に、化合物が血液 - 脳関門を通過するか（cross）どうかという問題であり、通過するのであれば、その化合物が毒性の効果を有するかどうかという問題であり；第2には、脳または中枢神経系内のどの部位で何らかの毒性の効果が局在化しているのかを決定しなければならず；第3には、どれくらいの用量の化合物がその効果を生じるか、およびどれくらいの用量が安全であるかである。

【0004】

培養物中における神経細胞についての研究は、毒性効果および用量効果についての一定の一般化されたデータを与え得るが、従来は、これらの問題は、行動学的研究（behavioural studies）を使用して（しばしば、Irwinプロフィールの形態で）研究されている。動物に注射する化合物の用量を漸次増加し、次いで、食餌、睡眠、運動などに関係しているパラメーター全体を観察し、そして評価する。これらのアッセイは、遅く、手段が厳しすぎ、さらに解釈が困難であるという欠点を有する。

【0005】

神経病理学の存在を決定する場合の問題は、その部位での損傷に関する特異的なマーカーが入手可能ではない場合に、脳の損傷または疾患の領域をどのように

認識するかということである。いくつかの障害（損傷、疾患など）は、非常に特異的な病理学的な特徴によって特徴付けられる。例えば、アルツハイマー病を特徴付けるリン酸化されたT a u、神経原線維のもつれ、およびパーキンソン病を特徴付けるドーパミン作動性神経細胞の枯渇である。しかし、多くの障害に関してはこのようなマーカーがなく、その結果として障害を定義することが困難となっている。このような障害の一例は、前頭葉痴呆症である。これは、（アルツハイマー病についての40%と比較して）全ての痴呆症のおそらく10%の原因であるが、この病因は、病理学が十分に定義されていないので、1つの障害として登録されることはほとんどない。別の例は、精神分裂病に関するものであり、ここでは、ほとんど疑いのないいくつかの神経病理学が存在する。にもかかわらず、定義があまりにも不十分であり、有用な基準であると認めることは困難である。

【0006】

精神分裂病は、それらの病因の大部分が不明である脳の疾患であるが、1つの現在の仮説は、障害の発端は、生命の初期にあり、おそらく、胎児期の脳の発達の間にあるというものである。この「神経発達仮説」は、脳の異常が、生命の初期に存在しつつも、後期青年期または初期成人期までは、それ自体は臨床的には完全には明らかにならないことを示唆する。この仮説は、疾患の神経病理学および疫学の研究から発展し、そしてより最近の画像研究によって支持されている。これらの画像研究は、精神分裂症患者の脳室の肥大、ならびに前頭葉および側頭葉の構造的な異常を実証した。このことは、一般的には、精神分裂症の脳の側頭葉および前頭葉の異常に関する神経病理学的報告と一致する。病理学的な研究はまた、皮質の発達において微妙な異常が存在し得ることを示す。神経膠腫を伴わない細胞構築の異常に関する知見は、精神分裂症が発育障害であるという証拠として受け取られている。それにもかかわらず、病理学的な知見は、それらの変異性、および精神分裂症患者において観察される前述したマーカーの変化が微妙であることによって、主に特徴付けられている。

【0007】

脳の発達期におけるPOUドメインの転写因子の発現の研究によると、S C I

P (抑制されたcAMP誘導性POU)と呼ばれ、Oct-6およびTst-1としてもまた公知である、特定の転写因子が、発達期の特定の脳細胞集団において発現されることを見出している。SCIPは、胚性幹(ES)細胞およびマウスの内部細胞塊中で発現され、発達に関して重要な役割を有するようである(Suzuki他、EMBO, 1990;9:3723-3732およびMeijer他、Nucleic Acids Res., 1990;18:7357-65)が、その最も特徴的な役割は、それが末梢神経系でのSchwann細胞の発達において果たされ、ここで、髄鞘形成の開始を適宜調節することである(Birmingham他、Genes Dev., 1996;15:1751-62)。

【0008】

げっ歯類の終脳の発達においては、SCIPは、神経細胞が、有糸分裂して、皮質のプレート(胚性の皮質灰白質)中のそれらの最終的な位置に移動すると発現する。これは、SCIPは、神経細胞が最初にそれらの神経細胞の本質および軸索突起を確立し始める間に、そして神経細胞がそれらの最終的な皮質層を見出す間に、発現することを意味する。出生後の脳においては、SCIPの発現はほとんどなくなるが、層5における神経細胞、大脳皮質の2/3における神経細胞、および海馬のCA1領域の特定の特異的な亜集団によって発現が維持される(Frantz他、J. Neurosci., 1994;14:472-485)。神経細胞の発達におけるSCIPの役割は知られていないが、その発現のタイミングを考慮すると、これが神経細胞の亜型の本質を確立することにおいて役割を果たし得ることが示唆される。

【0009】

現在、正常な成体の脳は最少レベルのSCIPタンパク質を発現することが発見されているが、脳が損傷を受けている場合には、SCIPは損傷部位の神経細胞によって有意なレベルで発現することが知られている。このことは、障害物質(damaging agent)の性質にかかわらずあてはまるようである。この現象は、例えば、限局性皮質形成異常および精神分裂症によって損傷したヒトの脳において、ならびに物理的な外傷、癲癇による電気活性、または虚血によって損傷したげっ歯類の脳において、実証されている。したがって、SCIPは、神経組織の損傷のマーカーとして使用され得る。さらに、SCIPの発現は安定であるようである。いったんSCIPが損傷にตอบสนองして発現すると、これは、何ヶ月もの間、

またはなお何年もの間、発現されたままになる。

【0010】

薬物の神経毒性を迅速にそして容易に決定するための方法が、および神経学的損傷（特に、それについてのマーカーが定義されていない神経学的損傷）の存在を決定するための方法が、当該分野で必要とされている。

【0011】

本発明は、神経学的損傷のマーカーとしてSCIPを使用することを提供する。

【0012】

本発明は、神経学的損傷を検出する方法を提供する。この方法は、神経細胞および/または神経組織中でのSCIP遺伝子の発現についてアッセイすることを含む。神経細胞および/または神経組織中でのSCIPの発現レベルの上昇が神経学的損傷の存在を示す。

【0013】

成体の神経細胞および/または神経組織（特に、脳）が最少レベルのSCIPタンパク質を発現することが見出されているが、神経細胞および/または神経組織が損傷されている場合には、SCIPの発現レベルが障害物質の性質とは無関係に、損傷部位の神経細胞によって増大することが見いだされている。発現レベルの増大は、SCIPをコードするmRNAまたはSCIPタンパク質の、標準的なアッセイ技術（例えば、標識されたポリヌクレオチドを使用するインサイチュハイブリダイゼーション、または標識された抗体分子を使用する免疫組織化学）により、容易に検出される。SCIPの発現のレベルは、mRNAまたはSCIPタンパク質のレベルによって測定される場合には、損傷していない対応する神経細胞および/または神経組織中でのレベルと比較して、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも100%増大するのが好ましい。したがって、神経組織中でのSCIP遺伝子の発現をアッセイすることによって、神経学的損傷が存在しているかどうかを決定することが可能である。

【0014】

用語「神経学的損傷」は、脳および中枢神経系を含む神経系の任意の損傷をい

う。好ましくは、この用語は、脳に対するいずれもの損傷を意味する。損傷は、不慮の事故によって、または物理的な損傷、虚血性障害、発育障害、または急性の神経毒性障害によって生じた損傷を含む疾患によって、引き起こされ得る。神経学的損傷の例として、神経細胞の減少を導く神経細胞の細胞傷害性損傷、神経細胞の突起および髄鞘形成の減少を導く軸索または樹状突起に対する損傷、神経膠細胞の増殖、瘢痕化、および細胞毒性の応答を導く神経系の炎症が挙げられる。神経学的損傷のさらなる例として、精神分裂症、または前頭葉痴呆症、および癲癇のような、精神医学的または神経退行性の障害が挙げられる。神経学的損傷はまた、例えば、強力な毒性薬剤の注射を含む毒性学の研究において、損傷が意図的に誘導されている動物内にあり得る。

【0015】

用語「SCIP遺伝子」は、ヒト、マウス、ラットのSCIP遺伝子、SCIP遺伝子と機能的に等価な任意の他のホモログまたはSCIP遺伝子の突然変異体を指す。ヒトのSCIP遺伝子の配列は、受入番号NM 002699 (Genebank)を有しており、Monuki他、Science, 249, 1300-1309, 1990に記載されている。ラットのSCIP遺伝子は、受入番号M72711 (Genebank)を有しており、Kuhn他、Mol. Cell. Biol, 11, 4642-4650, 1991に記載されている。マウスのSCIP遺伝子の配列は、受入番号M88302 (Genebank)を有しており、Hara他、PNAS USA, 89, 3280-3284, 1992に記載されている。ヒトのSCIP遺伝子とげっ歯類のSCIP遺伝子との間には大きな相同性があり、ヒトの配列はマウスおよびラットの配列に対して98.8%の相同性がある。

【0016】

用語「天然のSCIP遺伝子と機能的に等価なホモログおよび天然のSCIP遺伝子の突然変異体」は、ヒトのSCIP遺伝子の配列と少なくとも80%の配列相同性を有し、かつ神経学的損傷の部位で発現される任意のヌクレオチド配列を指す。好ましくは、SCIP遺伝子は、ヒトのSCIP遺伝子と少なくとも90%の配列相同性を有し、かつ神経学的損傷の部位で発現される。

【0017】

用語「S C I Pタンパク質」は、本明細書中で使用される場合には、上記で定義されるようなS C I P遺伝子によってコードされる任意のポリペプチドを指し、かつ炭水化物基の付加のように、翻訳後に修飾されたタンパク質を含む。

【0018】

用語「S C I P mRNA」は、本明細書中で使用される場合には、上記で定義されるようなS C I P遺伝子によって転写される任意のmRNAを指し、かつ切断型のmRNA転写物および代替的にスプライシングされたmRNA転写物を含む。

【0019】

S C I P遺伝子の発現は、任意の適切なアッセイ手順を使用することによってアッセイされ得る。好ましくは、S C I P遺伝子の発現は、S C I P遺伝子によってコードされるS C I Pタンパク質に対して親和性を有している抗体分子を使用してアッセイされる。あるいは、プローブ（例えば、標識されたポリヌクレオチドプローブ）が、S C I PをコードするmRNAの存在を同定するために使用され得る。S C I PをコードするmRNAを検出するために使用され得る、逆転写PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）のような多数の他の方法が存在することが、当業者に明らかであろう。

【0020】

神経組織は、脳および中枢神経系を含む任意の神経組織であり得り、そして神経細胞は任意の神経組織に由来し得る。好ましくは、神経組織は脳であり、より好ましくは、神経組織は、脳の大脳皮質である。

【0021】

特に好ましい実施形態では、本発明の方法は、被験体から神経細胞および/または神経組織のサンプルを得ること、およびS C I Pタンパク質が存在しているかどうかを決定するために、神経細胞および/または神経組織をS C I Pタンパク質に対して親和性を有する抗体分子と接触させることを含む。

【0022】

抗体分子は、S C I Pタンパク質に特異的に結合可能な任意の抗体分子であり得る。抗体分子は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。

S C I Pタンパク質に特異的に結合可能な抗体のフラグメント（例えば、F v、F a b、F (a b ')₂フラグメント、および単鎖F vフラグメント）もまた、使用され得る。抗体分子は、キメラ抗体分子のような組換えの抗体分子であり得る。このような抗体分子を産生するための方法は、当業者に周知である。

【0023】

抗体分子は標識されることが好ましい。適切な標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ（C A T）、ジゴキシゲニン（D I G）、フルオレセイン、および放射性同位元素、例えば¹²⁵I、³H、および¹⁴C、が挙げられる。

【0024】

使用される標識に依存して、標識された抗体分子が固定された量が、当業者に周知の標準的な方法を使用して決定され得る。例えば、標識がH R Pである場合には、酵素によりルミノールが分解し、それにより化学発光の放出が測定され得る。一方、放射活性標識が使用される場合には、標識の存在は、放出される放射線を検出することによって測定される。

【0025】

S C I Pタンパク質に対して親和性を有している第1の抗体分子、および第1の抗体分子に対して親和性を有している第2の標識された抗体分子を提供することも可能である。抗体分子をこのように組合せて使用することは、当業者に周知である。

【0026】

神経細胞および/または神経組織のサンプルを被験体から得て、そしてS C I P遺伝子によって転写される任意のm R N Aを認識するプローブと接触させる本発明の方法もまた、行われ得る。

【0027】

好ましくは、プローブは標識される。適切な標識として、抗体分子に関して上記に言及した標識のうちいずれか1つが挙げられる。好ましくは、プローブをジゴキシゲニンで標識し、そしてアルカリホスファターゼに結合した抗ジゴキシゲニン抗体を使用して検出する。このような抗体は、Boehringer Mannheimから入

手可能である。好ましくは、プローブは、RNAプローブまたはDNAプローブのような核酸プローブである。

【0028】

プローブは好ましくは、SCIP遺伝子によって転写される任意のmRNAの少なくとも一部の配列に対応する配列を有している核酸プローブである。プローブは、任意の大きさであり得るが、好ましくは、プローブは、約10~500、より好ましくは、約20~300、そして最も好ましくは、約30~200ヌクレオチド長である。

【0029】

プローブの配列が、SCIP遺伝子によって転写される任意のmRNAの任意の部分であって、SCIP遺伝子について特有である部分に対応することが好ましい。したがって、プローブは、POUホメオドメインまたはPOUドメインに対応している配列は有さないことが好ましい。POUホメオドメインおよびPOUドメインは、十分に定義されており、当業者に公知である。例えば、マウスのSCIP遺伝子のPOUホメオドメインは、マウスのSCIPタンパク質のアミノ酸335から396をコードし、そして、マウスのSCIP遺伝子のPOUドメインは、マウスのSCIPタンパク質のアミノ酸240から319をコードする。ヒトおよびラットのSCIP遺伝子のPOUホメオドメインおよびPOUドメインは、マウスのSCIP遺伝子中とほぼ同じ位置に存在する。

【0030】

好ましくは、プローブは、SCIPタンパク質のN末端領域をコードする部分であって、SCIP遺伝子によって転写される任意のmRNAの部分に対応する核酸プローブである。

【0031】

好ましくは、プローブは、T3およびT7ポリメラーゼを使用して以下の配列を転写することによって産生されるRNAプローブである。

```
5' ggaggcgggcgggcggggacccggccctgcaccacg
cactgcacgaggacggccacgaggcacagctggagc
cgtcggccaccaccgcaacctggggcgcacacgggacacg
```

c a c g g a c a t g c a c a c g c g g g c g g c c t g c a c g c g g c g
g c g g c g g c g c a c c t g c a c c g g g 3'

【0032】

本発明は、S C I Pタンパク質またはS C I P遺伝子から転写されたm R N Aのいずれかを認識する試薬を使用することによって、神経細胞および/または神経組織の損傷の領域を同定する手段を提供する。

【0033】

考慮中の神経細胞および/または神経組織が、神経学的損傷を有していると推定される被験体から採取され得る。神経細胞および/または神経組織は、検死によって採取され得るか、または生検として被験体が生存している間に採取され得る。被験体はヒトであり得るか、またはマウスもしくはラットのようなヒト以外の動物であり得る。

【0034】

神経組織は、従来の免疫組織化学のために、当該分野で行われている公知の標準的な手順を使用して調製され得る。例えば、神経組織が脳である場合には、脳は標準的な固定液（例えば、ホルマリン）中で固定され、次いでパラフィン中に包埋され、そしてミクロトーム上で切断される。あるいは、脳は凍結させられ、次いで低温維持装置（クリオスタット）上で切断される。このようにして調製された脳の切片は、次いで、例えば、免疫組織化学的に染色することによって、またはインサイチュウハイブリダイゼーションによって、S C I P遺伝子の発現について分析され得る。

【0035】

本発明はまた、S C I Pの発現を検出するためにキットを提供する。このキットは、S C I Pタンパク質に対して親和性を有している第1の抗体分子、第1の抗体分子に対して親和性を有している第2の標識された抗体分子、第2の抗体の標識と組合せた場合に着色反応を発生する展開剤、適切な緩衝稀釈剤、ならびに細胞および/または組織を染色し、抗体分子を使用して標識された物質を含有しているS C I Pとの対比をするための対比染色を含む。

【0036】

本発明はまた、インサイチュハイブリダイゼーション (ISH) によって SCIP の発現を検出するためのさらなるキットを提供する。ここでは、キットは、SCIP 遺伝子によって転写される任意の mRNA に対して相補的な配列をコードしており、かつ標識されている核酸プローブ、予備インキュベーションおよびインキュベーションステップのための緩衝溶液、標識された核酸プローブに対して親和性を有している標識された抗体分子、標識された抗体分子との接触の際に着色反応を発生する展開剤、適切な緩衝希釈剤、ならびに、細胞および/または組織を染色し、標識された核酸プローブおよび抗体分子を使用して標識された物質を含有している SCIP との対比をするための対比染色を含む。

【0037】

本発明のキットは、ネガティブおよび/またはポジティブな結果を得るための適切な成分を含むことがさらに好ましい。ポジティブな結果を得るための成分とは、対象の組織中で発現された遺伝子を検出するために使用される。これは、構成的に発現される遺伝子 (例えば、GAPDH) または組織特異的遺伝子であり得る。これは、神経系においては、神経線維、tau、またはグリア線維の酸性タンパク質であり得る。ネガティブな結果は、好ましくは、SCIP 遺伝子自体の配列を有しているヌクレオチドプローブを使用することによって得られる。これは、当業者に公知の標準的なアプローチである。

【0038】

上記に示されるように、抗体分子を使用して SCIP の発現を検出するためのキットは、以下を含む：

- ・ SCIP タンパク質に対して親和性を有している第 1 の抗体分子。
- ・ 第 1 の抗体分子に対して親和性を有している第 2 の抗体分子。通常は、第 2 の抗体分子は、その中で第 1 の抗体分子が惹起された種の免疫グロブリンに対して特異的に反応する第 2 の種の中で惹起された抗体である。第 2 の抗体分子は、好ましくは、間接的な免疫組織化学のために便利であるように、蛍光標識または酵素標識のいずれかに結合させる。蛍光標識の例は、FITC または RITC である；酵素標識の例は、HRP またはアルカリホスファターゼである。
- ・ 展開剤。これらは、第 2 の抗体分子の標識との接触の際に、着色反応が発生

するように使用される。例は、ペルオキシダーゼ連結結合体についてのジアミノベンジジンおよび過酸化水素である。展開剤は、適切な緩衝希釈剤とともに提供される。

- ・ 第1および第2の抗体分子の両方についての希釈剤は、代表的には、タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）の供給源、および界面活性剤（例えば、Triton-X100）を加えた緩衝生理食塩溶液を含む。
- ・ 細胞および/または組織を染色し、そしてSCIPを染色した物質との対比をするための対比染色は、当業者に周知である。

【0039】

上記に示されるように、ISHによってSCIPの発現を検出するためのキットは、以下を包含する：

- ・ SCIP遺伝子によって転写される任意のmRNAと同一である核酸プローブ、およびSCIP遺伝子によって転写される任意のmRNAと相補的である配列をコードする核酸プローブ。これらのプローブは、代表的には、続く検出のためにハプテン（例えば、ジゴキシゲニン）のような標識を有している。
- ・ この手順における種々のプレインキュベーションおよびインキュベーションステップにおいて使用する多数の緩衝溶液。
- ・ 標識された核酸に対して親和性を有している標識された抗体分子（例えば、標識（例えば、アルカリホスファターゼ）に結合した抗ジゴキシゲニン抗体）。この抗体分子についての希釈剤もまた好ましくは含まれる。
- ・ 展開剤。着色反応を発生する酵素試薬が、一般的に使用される。検出は、この着色反応に基づく。例は、ペルオキシダーゼ連結結合体についてはNBT（4-ニトロブルー塩化テトラゾリウム）ジアミノベンジジンと過酸化水素、およびBCIP（5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート）ジアミノベンジジンと過酸化水素、である。これらは、適切な緩衝希釈剤とともに提供される。
- ・ 細胞および/または組織を染色し、そしてSCIPを染色した物質との対比をするための、対比染色。

【0040】

本発明は、SCIPを発現する任意の神経細胞および/または神経組織を、標準的な顕微鏡検査法によって可視化することを可能にする。次いで、発現のパターンを、対照の動物（例えば、40週齢を超える成体のラットもしくはマウス）またはヒトと比較することにより、SCIPが損傷している領域のどの組織領域で特異的に発現しているかを同定することを可能にする。このSCIPの発現の同定によって、実施者は、被験体が神経学的損傷を有するかどうかを容易に決定することができる。実施者はまた、神経系のどの領域に悪影響が及ぼされているかを正確に特定することも可能である。これによって、被験体が罹患している疾患または供されている実験操作と、神経細胞および/または神経組織に対する損傷との関係について結論を導くことが可能になる。

【0041】

神経毒性学においては、本発明は、神経毒性試薬を同定する迅速かつ正確な手段を提供する。これは、新規の薬物の評価に対して、または他の化合物の毒性学的スクリーニング（例えば、潜在的な毒性環境因子または細菌毒素の評価）において有用である。

【0042】

神経病理学においては、本発明は、神経病理学の特異的なマーカーが利用できない疾患に関係している神経病理学の性質および部位を同定する、迅速かつ正確な手段を提供する。本発明は、生存している被験体または検死の被験体の診断として使用することができ、あるいは種々の神経学的傷害の病理研究のために使用することができる。

【0043】

本発明を、図面を参照して以下の実施例において本明細書中で説明する。

【0044】

実施例

材料および方法

組織の調製

ヒトの組織

外科用のサンプルを、MRC Brain Bank, Institute of Psychiatry, King's C

ollege Londonから、または緊急に外科標本から集めた。実施例1で使用したサンプルの人口統計学的な特徴を、表1および2に記載する。年齢、性別、または検死体の死後時間については、グループ間で有意な差異はなかった(表3)。排除の基準は、頭部の損傷、アルコール依存症、またはアルツハイマー病のような任意の中樞神経系に関係している障害があることとした。組織を、DSM-III-Rの基準に従って精神分裂症の臨床的な診断を受けた患者から得た。死亡の前月における神経弛緩剤への暴露の平均を、精神分裂症の被験体について概算し、クロルプロマジン当量(CPZE)で表した。

【0045】

別の組織標本もまた、限局性皮質形成異常またはアルツハイマー病のいずれかの病理学的な診断を受けた患者から得た。

【0046】

組織調製物は、標準的な組織病理学的標本とした。この標本を24~48時間の間、10%のホルマリン中で固定し、標本の大きさに応じて4~20個の切片に切断し、次いでパラフィンブロック中に包埋し、7µmに切断した。

【0047】

げっ歯類の組織

組織標本を、海馬領域に片側脳損傷を受けた40週齢を超えるBalbCマウスから、および全身虚血を誘導したWistarラットから採取した。組織標本を、4%のパラホルムアルデヒド中で4日で一晩、固定し、パラフィンワックス中に包埋し、7µmに切断した。

【0048】

神経毒性の傷害

成体のラットまたはマウスに、神経毒性作用を生じさせることが既知の化合物、例えば、フェニトイン(75mg/kg)または3-ニトロプロピオン酸(120mg/kg)、を腹腔内に注射した。この注射の翌日、上記動物を、認可された標準技法を使用して屠殺し、それらの脳を取り出し、免疫細胞化学のために処理した。この調製は、当業者にとって標準的な手順である。これは、4%のパラホルムアルデヒドでの組織の固定、30%のスクロース溶液中での一晩の液浸

による組織の凍結保護、次いで液体窒素中での組織の凍結を含む。次いで組織を、低温維持装置（クリオスタット）上で10 μ Mの厚さで切断する。次いで、組織切片を標準的な手順を使用して免疫細胞化学用に処理する。

【0049】

抗体の調製

組織切片を、タンパク質、SCIPと特異的に反応する抗体を使用して染色する。抗体は、Meijer他、Nucleic. Acids Res., 18, 7357-7365 (1990); Meijer他、Nucleic. Acids Res., 20, 2241-2247 (1992)の方法に従って調製し得る。典型的には、このような抗体は、SCIPをコードする発現プラスミドが導入されている大腸菌中で、タンパク質を過剰発現させ、そのタンパク質を精製して得た調製物に対して惹起させ得る。これは、pET11A発現ベクター（Novagen）のBamHI部位中におけるイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）誘導性T7プロモータの後に位置するpN1SCIPから、BamHI-BglIIフラグメントをクローニングすることによって達成し得る。Meijer他、Nucleic Acids Res., 18, 7357-7365 (1990); Meijerら、Nucl. Acid Res., 20, 2241-2247 (1992)を参照のこと。次いで、この遺伝構築物を大腸菌のBL21株にトランスフェクトし得る。一晚培養物を、1:10に希釈し、室温でOD₆₀₀ = 0.8まで培養する。IPTGを0.4 mMの最終濃度まで添加することによって、過剰発現を誘導し、培養物を4時間インキュベートする。

【0050】

大規模な精製のために、500 mlのIPTGで誘導した細菌培養物をペレット状にし、リン酸緩衝生理食塩溶液（PBS）で1回洗浄し、10 mlの6 Mの尿素/PBS中に再懸濁し、音波破碎する。細胞溶解物を、12000 rev./分で4にて5分間の遠心分離によって透明にする。

【0051】

イミダゾールを、0.8 mMの最終濃度になるまで細胞溶解物に添加し、300 μ lのNi-NTAビーズ（Qiagen）とともに4にて一晚インキュベートする。翌日、Ni-NTAを6 Mの尿素と80 mMのイミダゾールを含む10 mlのPBSで15分間、2回洗浄し、さらに6 Mの尿素と8 mMのイミダゾールを含

むPBSで3回洗浄する。SCIPタンパク質を、6Mの尿素と0.8mMのイミダゾールを含む500 μ lのPBS中で基質から溶離させる。この精製手順によって、高レベルの純度(>95%)かつ無傷のSCIPタンパク質(クマシー染色したポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって判断した場合)を調製することができる。Zwart他、Mech. Dev., 54, 185-194 (1996)を参照のこと。

【0052】

抗SCIP抗血清の生成

SCIPタンパク質を過剰発現させ、さらに精製した後、フロイントアジュバント中に再懸濁した0.5~1.0mgのSCIPタンパク質を3回連続して注射すること(それぞれの注射の間に4週間の間隔をあげる)によって、ウサギ(White New Zealand)の中で抗体を惹起させ得る。Zwart他、Mech. Dev., 54, 185-194 (1996)を参照のこと。

【0053】

SCIP抗体を、次いで、ニトロセルロース上に固定したSCIPタンパク質に結合することによって親和性(アフィニティー)精製する。1%のBSAと3%の粉ミルクと0.05%のTween-20を含むPBS中で4 \times にて2時間のブレインキュベートした後、ニトロセルロースを、室温で3時間BL21細胞溶解物を用いて予めクリアにした抗血清とともに一晚インキュベートする。PBSでの十分な洗浄の後、SCIP抗体を、3MのKSCNと0.1MのNaPO₄と500 μ g/mlのBSAを含む水溶液によってニトロセルロースから溶離する。KSCNを除去するために、抗体溶液を、0.1MのNaPO₄(pH 7.5)で平衡化したSephadex G-50カラム上を通過させる。Zwartら(前出)を参照のこと。

【0054】

この方法によって惹起させたSCIPポリクローナル抗血清は、高度に特異的である。なぜなら、これは、Oct-1/3/4、Brn-1/3/4のような他のPOUタンパク質と交差反応しないからである。これに加えて、ヒトおよびヒト配列を有するげっ歯類の間では、単離されたSCIP cDNAの相同性が

大きい (Tobler他、Nucleic Acids Res., 21, 1043 (1993))。マウスの配列 (Zimmerman他、Nucleic. Acids Res., 19, 956(1991)) およびラットの配列 (He他、Nature, 340, 6228(1989); Monuki他、Science, 249, 1300-1303 (1990)) に対しては、98.8%の相同性である。この抗体は、免疫組織化学的な用途において、げっ歯類およびヒトのSCIPタンパク質を検出するために使用される。

【0055】

免疫組織化学

切断した脳の検体を、組織切片中における免疫反応性SCIPの存在および位置を明らかにするために、免疫組織化学的に染色した。これは、標準的な免疫組織化学的手順を使用して行った。

【0056】

ワックスで包埋した切片のワックスを除去し、メタノール中で再水和した。凍結させた切片を-20℃で維持し、使用の直前に室温にした。その後、両方のタイプの材料についての手順は同じであった。非内因性のペルオキシダーゼの活性を遮断するために、切片を3%のH₂O₂を含むメタノール溶液とともに20分間インキュベートする。最初に蒸留水で、次いでTris緩衝生理食塩溶液(TBS)で十分に洗浄後、切片を、TBSで1:10に希釈した正常なブタ血清(Dako)で、室温にて30分間遮断した後、TBS中の1次抗SCIP(1:250)抗体中で、4℃にて一晩インキュベートする。

【0057】

明視野顕微鏡検査法のために、切片をDakoで1:200に希釈したビオチン化Swine抗ウサギ2次抗体とともに45分間インキュベートし、次いで、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(Vector Laboratories)とともに45分間インキュベートし、続いて5分間、PBSキット(Vector Laboratories)中のジアミノベンジジン(DAB)/0.03%の過酸化水素と反応させる。次いで、サンプルを、エタノール系中で脱水し、続いて、キシレンで3回すすぎ、次に媒体に固定したDPXに固定し、カバースライドをかける。

【0058】

蛍光顕微鏡検査法のために、免疫標識した切片を室温で1時間、1:200のウサギ結合蛍光マーカール（Vector）とともにインキュベートする。切片を、抗劣化媒体（Vectashield）中に包埋し、保存のためにカバースライドをかける。

【0059】

染色手順の後、SCIPの発現を、光学顕微鏡検査法および/または蛍光顕微鏡検査法によって検出し得る。SCIPを発現していた組織切片中の細胞は、抗体染色手順によって標識される。正常で損傷を受けていない成体の脳の材料においては、標識された細胞はまれである。これは、損傷によりSCIPの発現が誘導され、SCIPの免疫反応性は損傷の徴候を示し、SCIPの免疫反応性を有する部位が損傷の部位を示すことを示す。

【0060】

インサイチュウハイブリダイゼーション

SCIPの発現を、免疫組織化学ではなくインサイチュウハイブリダイゼーション（ISH）を使用して検出し得る。この場合には、タンパク質自体よりもむしろ、SCIPタンパク質をコードするmRNAの存在が検出される。ISHは、当業者に良く知られている標準技法である（Wilkinson, D. G., In Situ Hybridisation: A Practical Approach, 第1版、87-106, 1992）。損傷した脳の材料に由来する切片のワックスを、それぞれ10分間で3回、Histoclear中で除去し、続いてメタノール中でそれぞれ5分間で2回洗浄する。次いで、切片をそれぞれ5分間、PBTで調製した段階的な系列のメタノール溶液（100%、75%、50%、および25%）によって再水和し、PBTを用いてそれぞれ5分間で2回洗浄する。再水和後、切片を、PBT中の10µg/mlのプロテイナーゼK（Boehringer Mannheim）で37℃で10分間処理し、PBS中の4%のparaホルムアルデヒド中で20分間、再度固定し、0.1Mのトリエタノールアミンアセテートでアセチル化する。次いで、スライドを25%、50%、75%、および100%のメタノール系中でそれぞれ5分間脱水する。RNAプローブの非特異的な結合をブロックするために、切片を、5×SSC（0.3MのNaCl、0.03Mのクエン酸ナトリウム、pH7.4）、50%の脱イオン化ホルムアミド（BDH）、1mg/mlの酵母のtRNA（Boehringer Man

nheim)、5 mMのEDTA、50 μ g/mlのヘパリン、0.1%のtriton X-100、0.5%のCHAPS (Sigma)、および2%の遮断剤 (Boehringer Mannheim) を含有している緩衝液でプレハイブリダイズさせる。切片を、56 で2時間の間、プレハイブリダイズさせる。プレハイブリダイゼーション緩衝液にcRNAプローブ (最終濃度 5×10^6 cpm/ml) を添加することによって、ハイブリダイゼーション緩衝液を調製する。切片をハイブリダイゼーション緩衝液でカバーし、密閉した湿潤装置中で60 で一晩インキュベートする。ハイブリダイズした後、スライドを、60 で30分間、 $2 \times$ SSC/50%のホルムアミドで2回洗浄し、RNアーゼ (20 μ g/ml) で60 でさらに30分間処理する。 $2 \times$ SSCおよび $0.2 \times$ SSC中で15分間、それぞれ37 で十分に洗浄後、ハイブリダイズさせた切片を5%のヤギ血清 (Sigma) 中で1時間遮断し、1:3500に希釈したアルカリホスファターゼ結合ヒツジ抗DIG (Boehringer Mannheim) 中で4 で一晩インキュベートする。翌日、切片を、100 mMのTris-HCl (pH 7.5)、50 mMのMgCl₂、100 mMのNaCl、および0.1%のtriton X-100から調製したNTMT緩衝液で洗浄し、着色試薬NBT/BCIP (Boehringer Mannheim) 中で、十分なシグナルが生じるまでインキュベートする。次いで、シグナルを、4%のパラホルムアルデヒド中にスライドを浸すことによって固定する。次いで、切片を、クレシルバイオレット (Nissl) を用いて対比染色し、25%、50%、75%、および100%のメタノールの系中でそれぞれ5分間脱水し、続いてHistoClearを用いて清浄し、固定媒体DPX (BDH) を用いてカバースライドをかける。

【0061】

SCIP遺伝子によって転写される任意のmRNAについてのRNAプローブは、すでに一般的なドメイン中に存在する (Suzuki他、EMBO, 11, 3723-3732 (1990); Zwart他、Mech. Dev., 54, 185-194 (1996))。RNAプローブは、好ましくは、Bluescript (Stratagene) 中にサブクローニングされ、制限エンドヌクレアーゼSma Iを用いて直鎖状にされた、マウスのSCIP cDNAフラグメントの160 bp (5' ggaggcgcgcgcgaggac

c c g g c c t g c a c c a c g c a c t g c a c g a g g a c g g c c a c g
 a g g c a c a g c t g g a g c c g t c g c c a c c a c c g c a c c t g g
 g c g c a c a c g g a c a c g c a c g g a c a t g c a c a c g c g g g c
 g g c c t g c a c g c g g c g g c g g c g g c g c a c c t g c a c c g g
 g 3') である。RNAプローブは、次いで、T3およびT7ポリメラーゼを使用
 して、製造業者の説明書 (Promega) に従って転写し得る。発現パターンを、
 ジゴキシゲニン (DIG) - UTPで標識したセンスおよびアンチセンスRNA
 プローブ、ならびにアルカリホスファターゼに結合させた抗DIG抗体 (Boehr
 inger Mannheim) を使用して可視化する。

【0062】

免疫組織化学的な検出と同様に、SCIPの発現を、この方法によって検出
 することができる。これにより、SCIPの発現は、神経学的損傷の部位で増加す
 るように調節されており、それゆえ、SCIPの発現がこれらの損傷部位のマ
 ーカーであることが明らかになる。

【0063】

実施例1

アルツハイマー病を有する患者に由来する脳組織の分析

上記の方法に基づいて、側頭葉のブロックが外側膝状体の位置で採取され、こ
 れには海馬傍回および海馬が含まれていた。前頭葉のブロックを、脳梁幹の前方
 末端で鋭い腹側湾曲の位置で採取した。サンプルが採取された被験体を、表2に
 示す。免疫組織化学のために使用した全てのブロックを、10%のホルマリン中
 に固定し、続いて、パラフィンワックス中に包埋する前に、冠状面を切り取った
 。

【0064】

7 μmの厚みの切片を、SCIPタンパク質の存在および位置を明らかにする
 ために、標準的な免疫組織化学的手順を使用して染色した。簡潔には、切片から
 ワックスを除去し、メタノール中で再水和させ、1%のH₂O₂で30分間、予備
 処理した。次いで、切片を、0.001%のクエン酸/リン酸緩衝液 (pH 6
 .0) の溶液中で8分間、800Wでマイクロ波処理した。Tris緩衝生理食

塩溶液 (T B S) で十分に洗浄後、切片を、 T B S で 1 : 1 0 に希釈した正常なブタ血清 (Dako) で 3 0 分間ブロックし、次いで、 T B S で希釈した (1 : 2 5 0) 1 次ウサギポリクローナル抗 S C I P 抗体中で 4 時間で一晩インキュベートした。本研究において使用した S C I P ポリクローナル抗血清は、 S C I P の N 末端領域に対して惹起させて得たものである。この領域は、 O c t - 1 / 3 / 4 および B r n - 1 / 3 / 4 のような他の P O U タンパク質と最も相同性の低い領域である。前述のように、 3 ステップのアビジン - ビオチン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ複合システムを使用し (Dako, Ltd) 、抗体を、色素原であるジアミノベンジジン (V e c t o r) を使用して可視化した。陰性対照は、同時に処理した同一材料の切片から構成され、一次抗体を T B S によって置き換えて処理した組織切片から構成された。

【 0 0 6 5 】

ウェスタンブロット

タンパク質抽出物を、 3 例の精神分裂症および 3 例の対照の症例の、側頭葉および前頭葉から調製した。それぞれの抽出物を P B S で 2 回洗浄し、 1 % の N o n i d e t P - 4 0 溶解緩衝液 (0 . 5 M の T r i s - H C l (p H 8 . 0) 、 3 M の N a C l 、 0 . 5 M の E D T A 、 およびプロテアーゼ阻害剤として 2 μ g / m l のペプスタチン、 2 μ g / m l のロイペプチン、 1 μ g / m l のペプロトニンを含む) の添加および攪拌することによって溶解させた。可溶化させたサンプルを、次いで、 1 3 , 0 0 0 r p m で 4 分にて 1 0 分間遠心分離した。それぞれの抽出物についてのタンパク質濃度を、 D C タンパク質アッセイ (BioRad) を実施することによって概算した。タンパク質の定量化後、サンプルを、標準的なドデシル硫酸ナトリウム (S D S) サンプル緩衝液 (0 . 2 5 M の T r i s - H C l (p H 6 . 8) 、 0 . 2 % のプロモフェノールブルー、 4 0 % のグリセロール、 2 0 % の 2 - メルカプトエタノール、 および 8 % の S D S を含む) 中に可溶化させ、変性させ、 1 0 % の T r i s - ポリアクリルアミドゲル (BioRad) 上に充填し、 3 5 分間、定常の 2 0 0 ボルトで泳動した。次いで、分離したタンパク質を、半乾燥プロッティング装置 (BioRad) を使用して 0 . 2 μ m のニトロセルロースペーパー (Sigma) に移し、 3 0 分間、 1 0 ボルトで泳動した。ブ

ロットを、10%のカゼイン溶液 (Sigma) で30分間ブロックし、次いでこれらを、アビジンC / ビオチンキットを用いて、製造業者の説明書 (Sigma) に従って処理した。次に、膜を、TBS-T (25mMのTris-HCl (pH 7.5)、0.5MのNaCl、および0.3%のTween 20を含む) で洗浄し、TBS-Tで希釈した(1:3500) 1次ポリクローナル抗体抗SCIPとともに30分間インキュベートした。プロットを、TBS-Tで洗浄し、2次ビオチニル化ヤギ抗ウサギ抗体 (Vector) とともに30分間インキュベートした。最後に、Vectastain ABC複合システムを使用し (Vector)、プロットを色素原であるジアミノベンジジン (Vector) で、ビーズが明確に見られ得るまで処理した。陰性対照は、一次抗体をTBS-Tで置き換えて同時に処理した同一の切片のプロットで構成した。

【0066】

画像の分析

全ての切片を、画像分析ソフトウェア (Image Pro-plus) および動力化した載物台を備えるLeica光学顕微鏡を使用して分析した。このシステムにより、高倍率で個々に視覚化された別々の顕微鏡視野を互いに結びつけることが可能になり、海馬の構成を包含する大きな細片の単一の複合画像を形成することが可能になった。海馬の構成の境界を低倍率で引き、そしてそれぞれの亜領域を、以前に記載された標準的な基準を使用して描いた (Lorento de No, J. Psychiatry Neurol., 1934; 46: 113-177; Amaral DG, Insausti R: Hippocampal formation. In Paxinos G. (Ed.), The Human Nervous System. Academic Press 1990; 711-756)。5つの領域のそれぞれについて神経細胞をランダムに選択するために、海馬の複合画像を捕捉し、クロスグリッドをその上部に設置した。

【0067】

SCIPを染色した神経細胞の光学密度を、精神分裂症および対照の症例の両方について、CA1、CA2、CA3、CA4、および歯状回 (DG) の領域で、256点グレースケールを使用して定量化した。精神分裂症の症例については、その核の断面が可視化されている神経細胞の細胞質染色を分析した。対照の症

例については、海馬の細胞構築を同定し、神経細胞について同様に細胞質の分析を行うことを可能にするため、十分にバックグラウンドを染色した。光学密度の読み取り値を、クロスグリッドと交わる神経細胞についてのみ概算した。次いで、それぞれの領域の視野を横切る平均の光学密度の値を計算した。

【0068】

データを、Mann Whitney U rank sum試験 (SPSS 10.0) を使用して分析した。多数の比較について調整するために、Bonferroni補正項を適用し、0.01のp値を有意であるとみなした。

【0069】

結果

免疫組織化学的染色

SCIPは、全ての精神分裂症の海馬の被験体において広範囲で発現されたが、一方、対照の症例においてはバックグラウンドを上回る染色はわずかであったかまたは全く存在しなかった。SCIPの染色は、主に細胞質ゾルで観察され、これは、海馬のピラミッド状の細胞層、および歯状回の顆粒細胞層中に見られた(図1)。精神分裂症のサンプルの側頭葉においては、SCIPの染色は、CA1における染色よりも、CA2、CA3、CA4、および歯状の顆粒細胞層における染色のほうが、より顕著であった。同様の結論を、適合する対照の切片については導くことはできなかった。なぜなら、SCIPの免疫反応性が全く存在しなかったかまたはごくわずかに存在するだけであったからである。

【0070】

精神分裂症および対照のサンプル中でのSCIPの染色の強度を評価するために、光学密度のパターンを、CA1、CA2、CA3、CA4、および歯状回中ごとに定量化した。図2は、対照および精神分裂症のサンプルについての海馬のサブ領域あたりの平均光学密度の概算を示す。Mann Whitney U rank試験によると、試験した5つ全ての海馬の領域において、対照のグループと比較して精神分裂症のグループの光学密度の測定値はかなりの低下を示し、p値は精神分裂症と対照との間で全ての海馬の領域において0.001未満であった。これは、SCIPの染色の強度が、対照よりも精神分裂症の被験体におい

て有意に高かったことを示す。

【0071】

神経弛緩剤の投与、被験体の年齢、および/または検死の遅れが、SCIPの発現に影響を与え得る可能性を調べるために、上記の因子と、5つの領域のそれぞれについて得た平均の光学密度の値との相関関係を、Spearman's rank補正相関試験を使用して分析した。精神分裂症のグループにおいては、SCIPの染色と平均の神経弛緩剤に対する暴露(CPZE)との間に有意な相関関係はなかった(全ての領域において $p > 0.1$)。また、SCIPの染色と年齢または検死の遅延との間にも、全ての領域において有意な関係は見出されなかった(全ての症例において $p > 0.1$)。

【0072】

ウェスタン分析

SCIPのタンパク質レベルを、3例の精神分裂症および3例の適合する対照の前頭葉および側頭葉に由来する抽出物中で試験した。イムノブロットによって、SCIP抗体が、SCIPタンパク質と予想される約45kDaの単一のタンパク質を認識することを確認した。精神分裂症の検体の前頭葉および側頭葉においては高いレベルでSCIPが存在したが、一方、適合する対照の同じ領域中では、全くSCIPの発現がなかったかまたはごくわずかなSCIPの発現があった(図3)。

【0073】

結果は、広範囲のSCIPの免疫反応性が、精神分裂症の検体の前頭葉および側頭葉において存在し、一方、適合する対照中では、SCIPの発現が限られていることを実証する。この発見は、SCIPが、精神分裂症における神経病理学的なマーカーとして、さらには任意の神経学的損傷のマーカーとして有用であることを示す。

【0074】

神経毒性についての化合物の試験

化合物の神経毒性は、細胞、組織、または動物を試験化合物と接触させ、SCIPの発現について上記の方法によって試験するという、本発明に従って試験し

得る。S C I Pの発現のレベルの上昇は神経毒性を示し、したがって、神経毒性に至らない化合物が選択される。細胞、組織、または動物と化合物との接触方法は、当業者に既知である。

【0075】

本明細書中で言及される全ての参考文献は、本明細書中に参照により援用される。

【0076】

【表1】

側頭葉の免疫組織化学的研究のために使用した症例

症例	年齢	性別	診断	CPZE	PM 遅延	死因
1	24	M	S	200	29	腎不全
2	34	M	S	4000	21	心筋炎
3	46	F	S	600	96	心停止 (OD)
4	49	M	S	700	25	破裂動脈瘤
5	62	M	S	350	31	腹膜炎
6	68	M	S	200	45	心筋梗塞
7	73	M	S	0	25	肺炎
8	74	M	S	3500	23	心筋梗塞
9	75	M	S	500	94	肺炎
10	88	F	S	0	20	肺炎
11	20	M	C	-	26	多発外傷
12	33	F	C	-	96	肺塞栓
13	44	M	C	-	70	心筋梗塞
14	51	M	C	-	15	肺炎
15	63	M	C	-	26	冠状動脈閉塞
16	64	M	C	-	47	心筋梗塞
17	76	M	C	-	41	気管支肺炎
18	80	F	C	-	31	肺塞栓
19	80	M	C	-	35	左心室不全
20	86	M	C	-	6	心筋梗塞

CPZE : クロルプロマジン当量での、死亡前の1ヶ月の精神安定剤に対する一日の平均暴露

S : 精神分裂症

C : コントロール

PM : 検死

【0077】

【表2】

前頭葉および側頭葉のウエスタン分析のために使用した症例

症例	年齢	性別	診断	CPZE	PM 遅延	死因
21	32	F	S	500	46	肺塞栓
22	51	M	S	800	44	心筋梗塞
23	62	M	S	300	36	肺結核症
24	33	F	C	-	56	肺塞栓
25	51	M	C	-	52	慢性心筋症
26	67	M	C	-	41	心筋梗塞

CPZE：クロルプロマジン当量での、死亡前の1ヶ月の精神安定剤に対する一日の平均暴露

S：精神分裂症

C：コントロール

PM：検死

【0078】

【表3】

側頭葉の研究において、および前頭葉対側頭葉の研究において使用した、精神分裂症および対照のグループにおける人口統計学的な因子の比較

	側頭葉の研究		前頭葉および側頭葉の研究	
	精神分裂症	対照	精神分裂症	対照
年齢	59.3 (20.3)	59.7 (22.2)	48.3 (15.2)	50.3 (17.1)
性別	8M/2F	8M/2F	2M/1F	2M/1F
検死遅延	40.9 (29.3)	39.3 (26.6)	42 (5.3)	49.6 (7.8)

値は、平均および（標準偏差）

【図面の簡単な説明】

【図1】

海馬のCA4領域におけるSCIP染色を示す。目盛：50 μm。

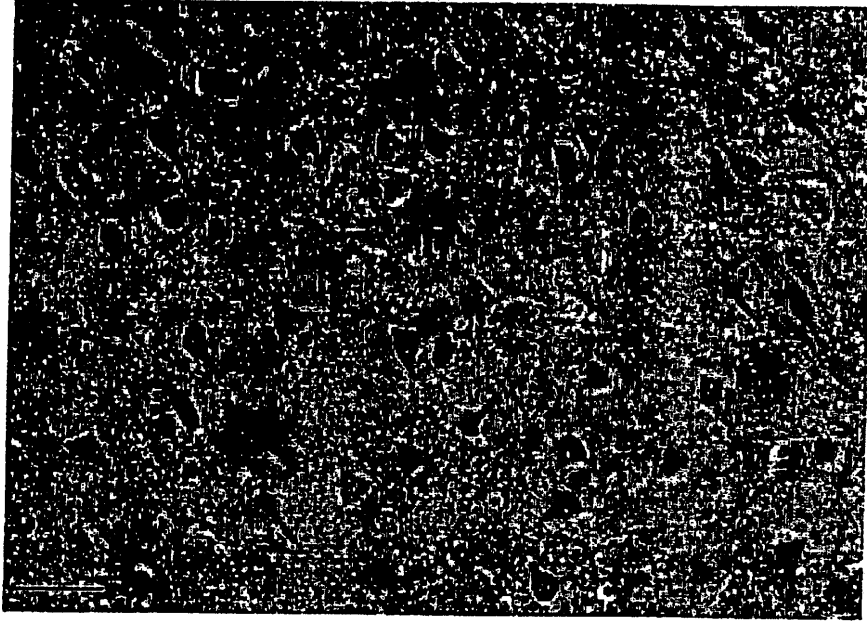
【図2】

精神分裂症および対照のグループについての、CA1、CA2、CA3、CA4、および歯状回(DG)の領域における、SCIPを染色した神経細胞の平均光学密度を示す。

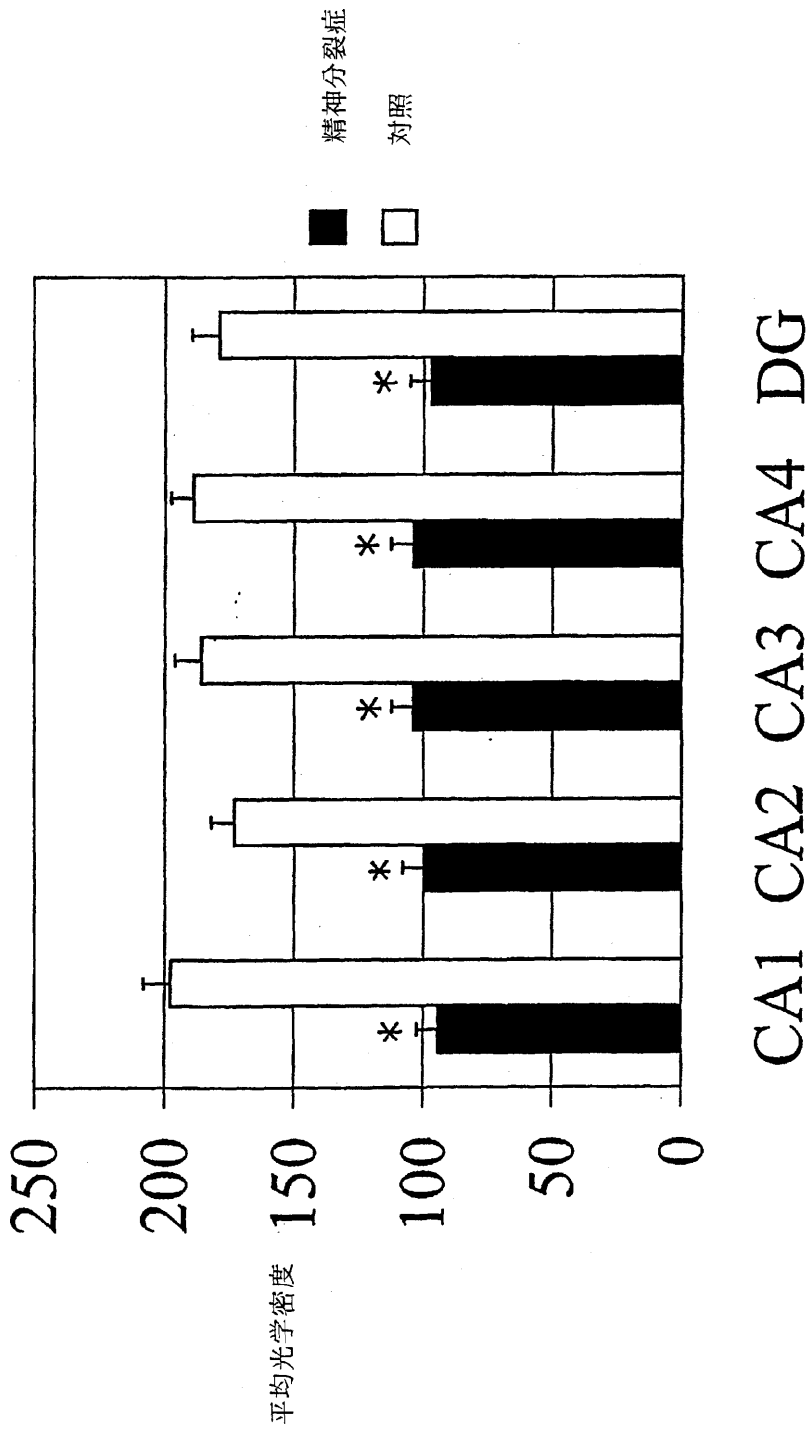
【図3】

ウェスタンブロット分析を示す。3例の精神分裂症の前頭葉および側頭葉に由来する脳抽出物を、SCIPに対するポリクローナル抗血清を使用して、適合した対照の同様の脳の領域と比較した。SCIPは、45 kDaの産物として認識された。

【図1】

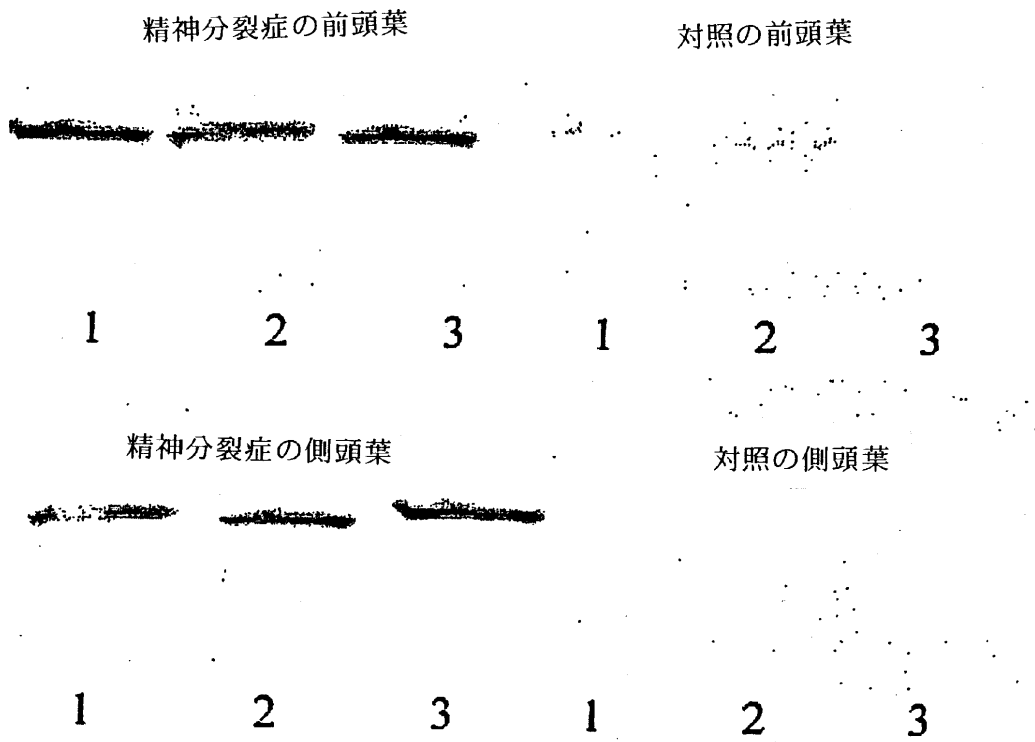


【图2】



海馬領域

【図3】



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成14年3月8日(2002.3.8)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】請求項1

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**請求項1**】 中枢神経系の神経細胞および/または神経組織中のSCIP遺伝子の発現についてアッセイすることを含む、中枢神経系の神経の損傷を検出する方法。

【**手続補正2**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】請求項4

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**請求項4**】 被験体の中枢神経系から神経細胞および/または神経組織のサンプルを得ること、ならびに、SCIPタンパク質が存在するかどうかを決定するために、該神経細胞および/または神経組織を、SCIPタンパク質に対して親和性を有している抗体分子と接触させることを含む、請求項2または請求項3に記載の方法。

【**手続補正3**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】請求項11

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**請求項11**】 被験体の中枢神経系からの神経細胞および/または神経組織のサンプルを得ること、および前記神経細胞および/または神経組織をSCIP mRNAを特異的に認識するプローブと接触させることを含む、請求項9または請求項10に記載の方法。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項20

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項20】 S C I Pタンパク質に対して親和性を有する第1の抗体分子、該第1の抗体分子に対して親和性を有する第2の標識された抗体分子、前記第2の抗体分子の標識との組み合わせにより着色反応を発生する展開剤、適切な緩衝希釈剤、ならびに神経細胞および/または神経組織を染色し、前記第1の抗体分子および第2の抗体分子を使用して標識された物質を含んでいる S C I P との対比をするための対比染色を含む、被験体の中枢神経系からの神経細胞および/または神経組織において S C I P 発現を検出するためのキット。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項22

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項22】 インサイチュールハイブリダイゼーション (I S H) によって 中枢神経系の神経細胞および/または神経組織における S C I P の発現を検出するためのキットであって、該キットは、 S C I P mRNA に対して相補的な配列をコードしており、かつ標識されている核酸プローブ、プレインキュベーションステップおよびインキュベーションステップのための緩衝溶液、前記標識されている核酸プローブに対して親和性を有しており、かつ標識されている抗体分子、該標識されている抗体分子との接触により着色反応を発生する展開剤、適切な緩衝希釈剤、ならびに、神経細胞および/または神経組織を染色し、前記標識されている核酸プローブおよび抗体分子を使用して標識された物質を含んでいる S C I P との対比をするための対比染色を含むキット。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項24

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項24】 請求項1～19のいずれか一項に記載の方法を使用して、または請求項20～23のいずれか一項に記載のキットを使用して、被験体の中枢神経系細胞におけるSCIPの発現レベルの増大についてアッセイすることを含む、被験体の精神分裂症を検出するための方法。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項25

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項25】 中枢神経系の神経細胞および/または神経組織を試験化合物と接触させること、ならびに該神経細胞および/または神経組織中でのSCIPの発現についてアッセイすることを含む、試験化合物の神経毒性をアッセイするための方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/GB 01/01442
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZORICK TODD S ET AL: "The transcription factors SCIP and Krox-20 Mark distinct stages and cell fates in Schwann cell differentiation." MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCE, vol. 8, no. 2-3, 1996, pages 129-145, XP002178448 ISSN: 1044-7431 page 130, right-hand column, paragraph 2 page 135, left-hand column, paragraph 2 -page 136, right-hand column figures 4,5 --- -/--	1-8,20, 21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
^a Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "B" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 September 2001		Date of mailing of the international search report 08.01.2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eponl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

2

Form PCT/ISA/10 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/GB 01/01442

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>MONUKI E S ET AL: "EXPRESSION AND ACTIVITY OF THE POU TRANSCRIPTION FACTOR SCIP" SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 249, no. 4974, 1990, pages 1300-1303, XP001015916 ISSN: 0036-8075 cited in the application</p>	1,2
A	<p>abstract page 1301, left-hand column, line 11 - line 20 page 1301, left-hand column, paragraph 3 -right-hand column, paragraph 1; figure 2 ---</p>	
X	<p>EINHEBER S ET AL: "Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions." JOURNAL OF CELL BIOLOGY, (1995 APR) 129 (2) 443-58., XP001023059 page 444, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 1 page 445, left-hand column, line 16 page 445, right-hand column, paragraph 4 -page 446, left-hand column, paragraph 1 page 448, left-hand column, line 7 - line 13; table 1 ---</p>	1-8,20, 21
X	<p>GONDRE M ET AL: "Accelerated nerve regeneration mediated by Schwann cells expressing a mutant form of the POU protein SCIP." JOURNAL OF CELL BIOLOGY, (1998 APR 20) 141 (2) 493-501., XP001023020 abstract page 493, right-hand column, paragraph 2 page 494, left-hand column, paragraph 2 ---</p>	1,2
A	<p>BLANCHARD ANDREW D ET AL: "Oct-6 (SCIP/Tst-1) is expressed in Schwann cell precursors, embryonic Schwann cells, and postnatal myelinating Schwann cells: Comparison with Oct-1, Krox-20, and Pax-3." JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 46, no. 5, 1996, pages 630-640, XP001023845 ISSN: 0360-4012 page 631, right-hand column, paragraphs 2,3 page 632, left-hand column, paragraph 4 -right-hand column, paragraph 2; figure 1 ---</p>	1-8,20, 21
	-/--	

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/GB 01/01442

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>BÖGLER O ET AL: "Single cell analysis of the expression of a nuclear protein, SCIP, by fluorescent immunohistochemistry visualized with confocal microscopy" HISTOCHEMICAL JOURNAL, (1993 OCT) 25 (10) 746-61., XP001023847</p> <p>page 747, left-hand column, paragraph 3 -right-hand column, paragraph 1</p> <p>page 747, right-hand column, line 56 - line 58</p> <p>page 748, left-hand column, paragraph 2; figure 2</p> <p>page 755, right-hand column, paragraph 2</p> <p>---</p>	1-4,6-8, 20,21
A	<p>POWERS RICHARD E: "The neuropathology of schizophrenia." JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY & EXPERIMENTAL NEUROLOGY, vol. 58, no. 7, July 1999 (1999-07), pages 679-690, XP001030115</p> <p>ISSN: 0022-3069</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1,24
P,X	<p>ILIA M ET AL: "Visualisation of areas of brain damage via SCIP." EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 12, no. Supplement 11, 8 June 2000 (2000-06-08), page 217</p> <p>XP001023184</p> <p>Meeting of the Federation of European Neuroscience Societies;Brighton, UK; June 24-28, 2000</p> <p>ISSN: 0953-816X</p> <p>abstract</p> <p>-----</p>	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 01/01442**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see further information sheet invention 1.

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1, 24 (partially), 2-8, 20, 21 (fully)

A method of detecting neurological damage assaying for the presence of SCIP protein

2. Claims: 1, 24 (partially), 9-19, 22, 23 (fully)

A method of detecting neurological damage assaying for the presence of SCIP mRNA

3. Claims: 25-29

A method for assaying neurotoxicity of a test compound

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
G 0 1 N	33/48	G 0 1 N	B
	33/577		A
	33/58		Z
		C 1 2 N	A
		15/00	

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

(72)発明者 プライス, ジャック
イギリス ロンドン エスイー5 8エー
エフ デンマーク ヒル 1 ウィンザー
ウォーク インスティテュート オブ
サイカイアトリー デパートメント オブ
ニューロサイエンス アンド サイコロ
ジカル メディシン アンド ニューロパ
ソロジー アンド クリニカル ニューロ
ファーマコロジー

Fターム(参考) 2G045 AA29 BB10 BB20 BB22 BB24
BB29 BB50 BB51 DA13 DA14
DA36 FB02 FB03
4B024 AA11 CA09 HA14
4B063 QA05 QA19 QQ08 QQ43 QQ53
QR56 QR77 QS34 QX01

专利名称(译)	检测神经组织损伤		
公开(公告)号	JP2003529769A	公开(公告)日	2003-10-07
申请号	JP2001572877	申请日	2001-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	伦敦国王学院		
申请(专利权)人(译)	伦敦大学国王学院		
[标]发明人	プライスジャック		
发明人	プライス,ジャック		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6841 C12Q1/6883 G01N33/48 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q1/6841 C12Q2600/158 G01N33/6896 G01N2333/4703		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Y G01N33/53.D C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/48.P G01N33/577.B G01N33/58.A G01N33/58.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/BB29 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/HA14 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063/QX01		
优先权	2000007778 2000-03-30 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及神经毒理学和神经病理学领域的诊断，更具体地涉及对神经组织损伤区域的可视化。特别地，本发明涉及SCIP作为神经损伤标志物的用途。

