

(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2005-508653

(P2005-508653A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 6 3
C O 7 K 14/47	C O 7 K 14/47	4 B O 6 4
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-544186 (P2003-544186)	(71) 出願人	591054174 イェシバ・ユニバーシティ YESHIVA UNIVERSITY アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ブロンクス、モリス・パーク・アベニュー 1300
(86) (22) 出願日	平成14年11月12日 (2002.11.12)	(74) 代理人	100057874 弁理士 曾我 道照
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月13日 (2004.5.13)	(74) 代理人	100110423 弁理士 曾我 道治
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/036315	(74) 代理人	100084010 弁理士 古川 秀利
(87) 国際公開番号	W02003/042366	(74) 代理人	100094695 弁理士 鈴木 憲七
(87) 国際公開日	平成15年5月22日 (2003.5.22)		
(31) 優先権主張番号	60/350,316		
(32) 優先日	平成13年11月13日 (2001.11.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規サイトヒン遺伝子およびこれの使用

(57) 【要約】

本発明は、サイトヒン (S T H) をコード化する単離された核酸配列、該配列へとハイブリダイゼーションする単離された核酸配列、該核酸配列によりコード化される精製されたタンパク質を提供する。本発明は、精製された S T H タンパク質、および S T H タンパク質を作る方法も提供する。本発明は更に、S T H に特異的な抗体、および該抗体を産生する方法を指向するものである。加えて、本発明は、S T H をコード化する核酸配列を含むベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞、および遺伝子導入非ヒト動物を開示する。本発明は更に、被験者が神経変性疾患を持っているか、もしくはこれを進展させるリスクが増大しているかどうかを決定する方法、および該被験者の予後を査定する方法を提供する。最後に、本発明は、被験者が、神経変性疾患を持っているか、もしくはこれを進展させるリスクが増大しているかどうかを決定するためのキットを開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サイトヒン (S T H) をコード化する、単離された核酸配列。

【請求項 2】

D N A、c D N A、または R N A である、請求項 1 に記載の核酸配列。

【請求項 3】

サイトヒン - Q (S T H - Q) 対立遺伝子である、請求項 1 に記載の核酸配列。

【請求項 4】

図 1 において説明されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の核酸配列。

【請求項 5】

図 3 において説明されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコード化する、請求項 1 に記載の核酸配列。

【請求項 6】

高ストリンジェント条件下に、図 1 において説明されるヌクレオチド配列またはこれの連続断片に相補的な第 2 の核酸配列へとハイブリダイゼーションする、単離された核酸配列。

【請求項 7】

サイトヒン - R (S T H - R) 対立遺伝子である、請求項 1 に記載の核酸配列。

【請求項 8】

図 2 において説明されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の核酸配列。

【請求項 9】

図 3 において説明されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコード化する、請求項 1 に記載の核酸配列。

【請求項 10】

高ストリンジェント条件下に、図 2 において説明されるヌクレオチド配列またはこれの連続断片に相補的な第 2 の核酸配列へとハイブリダイゼーションする、単離された核酸配列。

【請求項 11】

精製されたサイトヒンタンパク質。

【請求項 12】

サイトヒン - Q (S T H - Q) アイソフォームである、請求項 11 に記載のタンパク質。

【請求項 13】

図 3 において説明されるアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載のタンパク質。

【請求項 14】

図 1 において説明されるヌクレオチド配列によりコード化される、請求項 11 に記載のタンパク質。

【請求項 15】

サイトヒン - R (S T H - R) アイソフォームである、請求項 11 に記載のタンパク質。

【請求項 16】

図 4 において説明されるアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載のタンパク質。

【請求項 17】

図 2 において説明されるヌクレオチド配列によりコード化される、請求項 11 に記載のタンパク質。

【請求項 18】

高ストリンジェント条件下に、図 1 において説明されるヌクレオチド配列またはこれの連続断片に相補的な第 2 の核酸配列へとハイブリダイゼーションする核酸配列によりコード化される、精製されたタンパク質。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

高ストリンジェント条件下に、図 2 において説明されるヌクレオチド配列またはこれの連続断片に相補的な第 2 の核酸配列へとハイブリダイゼーションする核酸配列によりコード化される、精製されたタンパク質。

【請求項 20】

サイトヒン (S T H) タンパク質に特異的な抗体。

【請求項 21】

前記 S T H タンパク質が S T H - Q アイソフォームである、請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 22】

前記 S T H タンパク質が S T H - R アイソフォームである、請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 23】

サイトヒン (S T H) タンパク質に特異的な抗体を産生する方法であって、

(a) 哺乳類を S T H タンパク質で免疫し；および

(b) 該哺乳類の組織から、または該哺乳類の組織を使用して作られたハイブリドーマから抗体を精製する

段階を含む方法。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の方法により産生される抗体。

【請求項 25】

前記 S T H タンパク質が S T H - Q アイソフォームである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 S T H タンパク質が S T H - R アイソフォームである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

サイトヒン (S T H) をコード化する核酸配列を含むベクター。

【請求項 28】

前記核酸配列がサイトヒン - Q (S T H - Q) 対立遺伝子である、請求項 27 に記載のベクター。

【請求項 29】

前記核酸配列が図 1 において説明されるヌクレオチド配列またはこれの連続断片を含む、請求項 27 に記載のベクター。

【請求項 30】

前記核酸配列が、高ストリンジェント条件下に、図 1 において説明されるヌクレオチド配列またはこれの連続断片に相補的な核酸配列へとハイブリダイゼーションする、請求項 27 に記載のベクター。

【請求項 31】

前記核酸配列がサイトヒン - R (S T H - R) 対立遺伝子である、請求項 27 に記載のベクター。

【請求項 32】

前記核酸配列が、図 2 において説明されるヌクレオチド配列またはこれの連続断片を含む、請求項 27 に記載のベクター。

【請求項 33】

前記核酸配列が、高ストリンジェント条件下に、図 2 において説明されるヌクレオチド配列またはこれの連続断片に相補的な核酸配列へとハイブリダイゼーションする、請求項 27 に記載のベクター。

【請求項 34】

請求項 27 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 35】

請求項 28 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 36】

請求項 31 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 37】

10

20

30

40

50

サイトヒン (S T H) タンパク質を作る方法であって、

(a) 宿主細胞中へ、 S T H をコード化する核酸配列を導入し；

(b) 該核酸配列が発現されて S T H タンパク質を産生するような条件下に、該宿主細胞を維持し；および

(c) 該 S T H タンパク質を回収する

段階を含む方法。

【請求項 38】

前記 S T H タンパク質が S T H - Q アイソフォームである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記 S T H タンパク質が S T H - R アイソフォームである、請求項 37 に記載の方法。

10

【請求項 40】

ゲノムがその内因性 S T H 遺伝子中で分断を含む、遺伝子導入非ヒト動物。

【請求項 41】

前記分断が前記 S T H 遺伝子中のノックアウト突然変異である、請求項 40 に記載の遺伝子導入動物。

【請求項 42】

サイトヒン (S T H) タンパク質を過剰に発現する遺伝子導入非ヒト動物。

【請求項 43】

前記 S T H タンパク質がサイトヒン - Q アイソフォームである、請求項 42 に記載の遺伝子導入動物。

20

【請求項 44】

前記 S T H タンパク質がサイトヒン - R アイソフォームである、請求項 42 に記載の遺伝子導入動物。

【請求項 45】

被験者がアルツハイマー病 (A D) を持っているか、または A D を進展させるリスクが増大しているかどうかを決定する方法であって、サイトヒン (S T H) の 1 つ以上の対立遺伝子の存在に関して、該被験者の診断サンプルをアッセイすることを含み、ここで S T H - R 対立遺伝子の存在の検出が、該被験者が A D を持っているか、または A D を進展させるリスクが増大していることを指し示す方法。

【請求項 46】

30

前記診断サンプルが、 S T H をコード化する核酸へとハイブリダイゼーションする少なくとも 1 つの核酸プローブを使用してアッセイされる、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記核酸プローブが D N A または R N A である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

前記核酸プローブが検出可能なマーカーで標識された、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記診断サンプルが、 S T H タンパク質の 1 つ以上のアイソフォームの発現に関してアッセイすることにより、 S T H の 1 つ以上の対立遺伝子の存在に関してアッセイされる、請求項 45 に記載の方法。

40

【請求項 50】

前記診断サンプルが、 S T H と反応性の物質を使用してアッセイされる、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 51】

前記物質が検出可能なマーカーで標識される、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記物質が抗体である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 53】

前記抗体が検出可能なマーカーで標識される、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

50

アルツハイマー病 (A D) を持っているか、またはこれを進展させるかも知れない被験者の予後を査定する方法であって、サイトヒン (S T H) の 1 つ以上の対立遺伝子の存在に関して、該被験者の診断サンプルをアッセイすることを含み、ここで、該被験者の該診断サンプル中の 2 つの S T H - R 対立遺伝子の存在が、該被験者に関してのより悲観的な予後を指し示す方法。

【請求項 5 5】

前記診断サンプルが、S T H をコード化する核酸へとハイブリダイゼーションする少なくとも 1 つの核酸プローブを使用してアッセイされる、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記診断サンプルが、S T H タンパク質の 1 つ以上のアイソフォームの発現に関してアッセイすることにより、S T H の 1 つ以上の対立遺伝子の存在に関してアッセイされる、請求項 5 4 に記載の方法。 10

【請求項 5 7】

前記診断サンプルが、S T H と反応性の物質を使用してアッセイされる、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 8】

被験者がアルツハイマー病 (A D) を持っているか、または A D を進展させるリスクが増大しているかを決定するためのキットであって、サイトヒン (S T H) の 1 つ以上の対立遺伝子の存在を検出する試薬、および該被験者がアルツハイマー病 (A D) を持っているか、または A D を進展させるリスクが増大しているかを決定するためのキットを使用することに関する説明書を含むキット。 20

【請求項 5 9】

更に容器を含む、請求項 5 8 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[政府の権利についての陳述]

本発明は、N I M H Grant No. 38623 の下に、政府の支援と共になされた。これ故に、米国政府は、本発明における所定の権利を持つ。

【背景技術】

【0002】

[本発明の背景]

アルツハイマー病 (A D) は、認知機能の進行性で容赦ない喪失により特徴付けられる神経変性疾患である (1)。A D は、最もよく見られる後発性の痴呆であり、世界の先進国の何百万人の人々に影響を及ぼしている。約 4 , 0 0 0 , 0 0 0 人のアメリカ人がアルツハイマー病に苦しみ、その年間コストは約 \$ 1 0 0 , 0 0 0 , 0 0 0 , 0 0 0 であり、A D を、3 番目に最もコストのかかる加齢疾患にしている。この疾患は、男性における約 2 倍女性においてよく起こり、高齢者における痴呆の 6 5 % よりも多くを数える。早期の同定が A D のような進行性の病状においては決定的であり、これはより早期の処置が、認知機能の保存において、より遅い処置よりもより有効であることがあるからである。更に、早期の検出は、処置および介護の選択肢に触れさせる時間を許容することがある。しかしながら現在までに、アルツハイマー病に関しての治癒は得られておらず、認知の衰えは不可避である。 40

【0003】

A D は、2 つの主要な神経病理学的特徴を持っている：細胞外凝集、いわゆるアミロイド斑、神経炎斑、もしくは老人斑であり、これは、アミロイド核の周りの神経突起、星状細胞、およびグリア細胞から構成され、ならびにこれは、大脳皮質中に位置される；細胞内凝集、いわゆる神経繊維の絡み合いであり、これは組になった渦巻き状のフィラメントから構成される。老人斑および神経繊維の絡み合いが通常の老化に伴って起きる一方、それらはアルツハイマー病を患っている人たちにおいては、遙かにより罹患している。A D 50

の進展は、多くの環境による傷害が引き金となり得るが、遺伝子研究は、特定の遺伝子の突然変異および多型が、この変性過程へ罹患性を与え得る。

【0004】

アルツハイマー病患者の遺伝子研究は、幾つかの早期発症 (< 65歳) の疾患リスク要因 (例えば、アミロイド前駆体タンパク質、プレセニリン1およびプレセニリン2における突然変異)、および後発性 (> 65歳) の疾患リスク要因、アポリポタンパク質EのE4対立遺伝子 (ApoE4) (例えば、米国特許第5,716,828号; 米国特許第5,767,248号; および米国特許第6,136,530号参照) を同定した。この後発性AD (LOAD) 集団中、50%の被験者だけが、このApoE4対立遺伝子を持っていることが示されており、ADに関連する更なる遺伝子リスク要因の存在を支持する証拠を突き付けている。実際、LOADの影響を受けた子孫の夫婦の最近の関連した研究は、リスク要因遺伝子を宿しているかも知れない染色体9および10上の遺伝子座を同定している(2)。

10

【0005】

現在までに、ADに関する既知のリスク要因は、アミロイド産生または沈着を調節することが示されている; が、ADの診断に関してはどれも必要または充分ではなく、どれもが神経繊維の絡み合い (NFT) の形成における役割を論証していない。NFTに関する更なる研究が、通常は可溶性のタンパク質であるタウ () の、NFTにおいて検出される過剰にリン酸化された不溶性のタンパク質への変換に関する研究と共に行われた。微小管会合タンパク質であるタウは、神経の形状を樹立し維持するのに重要である。通常細胞におけるその役割に加えて、タウタンパク質は、神経内凝集物の主要な成分として、ADを包含する多くの神経変性疾患に含まれる。タウの病理を伴うより多く見られる疾患内の幾つかは、前頭葉側頭葉痴呆 (FTD)、ピック病、および進行性核上麻痺 (PSP) を包含する(3)。これらの疾病においてタウが含まれることは、これらの疾病の進行におけるその機能および役割へと多くの調査を促進させた。

20

【0006】

最近、タウをコードしている幾つかの突然変異がFTDとは乖離することが示され、タウの凝集を進展させるFTD-タウ突然変異P301Lを発現する遺伝子導入マウスを用いた幾つかの興味を惹かれる結果があった(3,4)。しかしながら、ADにおいては、このタウ遺伝子においては全く突然変異は見出されず、このことは、他の要因がタウ凝集物の形成に含まれているようであることを示唆している。これらの要因は、タウの病理を伴う他の神経変性疾患を暗示している可能性がある(5~9)。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

FTDおよびPSPの被験者において、このタウ遺伝子座に関する最近の遺伝子研究は、幾つかの突然変異および多型がそれぞれ、これらの疾病とは乖離することを示した(3)。該タウ遺伝子座中の隣接する遺伝子の同定および調査は、PSPにおける分子遺伝学的リスク要因の研究において価値を有し得るであろうが、これは、タウをコードするかまたはイントロンの報告された突然変異がないからである(10)。この情報もまた、PSPに関してだけでなく、ADのような他の神経変性疾患に対しても有用であり得よう。ADおよび他の神経変性疾患に関連する新しいリスク要因の同定は、このような疾患の診断において、これらの疾病を指向した将来の予防および治療基準を簡単にすることを支援するかも知れない。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

[本発明の要約]

本発明は、該タウ遺伝子座内の新規遺伝子サイトヒン (saitohin、STH) の同定、およびこのSTH遺伝子のサイトヒン-R (STH-R) 対立遺伝子がアルツハイマー病 (「AD」) を進展させる増大したリスクと関連しているという観測に基づいている。これ

50

らの知見を元に、本発明の目的は、S T H - QおよびS T H - R両方の対立遺伝子を包含するサイトヒン(S T H)をコード化する単離された核酸配列、および、S T Hをコード化する核酸配列に相補的な第2の核酸配列へ、高ストリンジェント条件下にハイブリダイゼーションする単離された核酸配列を提供することである。

【0009】

本発明は、S T H - QおよびS T H - R両方のアイソフォームを包含する精製サイトヒン(S T H)タンパク質、および、該S T H - QおよびS T H - R対立遺伝子の両方を包含するS T Hをコード化する核酸配列に相補的な第2の核酸配列へ、高ストリンジェント条件下にハイブリダイゼーションする核酸配列によりコード化される精製タンパク質をも開示する。該S T H - QおよびS T H - Rアイソフォーム両方を包含するS T Hタンパク質を作る方法も、提供される。

10

【0010】

本発明は、該S T H - QおよびS T H - Rアイソフォーム両方を包含するサイトヒン(S T H)タンパク質に特異的な抗体、および、該S T H - QおよびS T H - Rアイソフォーム両方を包含するS T Hタンパク質に特異的な抗体を産生する方法を、更に指向するものである。

【0011】

加えて、本発明は、該S T H - QおよびS T H - R対立遺伝子両方を包含するサイトヒン(S T H)をコード化する核酸配列を含むベクター、および、該S T H - QおよびS T H - R対立遺伝子両方を包含するS T Hをコード化する核酸配列を含むベクターを用いて形質転換された宿主細胞を開示する。

20

【0012】

本発明は、ゲノムがその内因性S T H遺伝子において分断(disruption)を含む遺伝子導入非ヒト動物、および、該S T H - QおよびS T H - Rアイソフォーム両方を包含するサイトヒン(S T H)タンパク質を過剰に発現する遺伝子導入非ヒト動物をも指向するものである。

【0013】

本発明は、サイトヒン(S T H)の1つ以上の対立遺伝子の存在に関して、被験者の診断サンプルをアッセイすることを含む、該被験者が神経変性疾患を持っているか、または神経変性疾患を進展させるリスクが増大しているかを決定する方法を更に提供し、ここでS T H - R対立遺伝子の存在の検出は、該被験者が、神経変性疾患を持っているか、またはこれを進展させるリスクが増大していることを指し示すものである。

30

【0014】

本発明は、サイトヒン(S T H)の1つ以上の対立遺伝子の存在に関して、被験者の診断サンプルをアッセイすることを含む、神経変性疾患を持っているか、またはこれを進展させるかも知れない該被験者の予後を査定する方法をも提供し、ここで該被験者の診断サンプル中における2つのS T H - R対立遺伝子の存在は、該被験者に関してのより悲観的な予後を指し示す。

【0015】

最後に、本発明は、被験者が神経変性疾患を持っているか、または神経変性疾患を進展させるリスクが増大しているかを決定するキットを開示する。

40

【0016】

本発明の更なる目的は、以下に伴う記載の観点から明らかであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

[本発明の詳細な説明]

本発明は、染色体17上に位置され、微小管関連タンパク質であるタウをコード化する遺伝子のイントロン内にある新規遺伝子サイトヒン(S T H)を指向するものである。本明細書中で開示されるように、このサイトヒン遺伝子は、ヒトの集団においては、少なくとも2つの形態または対立遺伝子中に存在する。1つの形態においては、本明細書中で「

50

サイトヒン - Q (S T H - Q) 」として言及され、この126番目のヌクレオチドはAであり、これは結果的に、S T Hタンパク質のこのS T H - Qアイソフォーム (isoform) の7番目の位置にてQ (グルタミン) になっている。S T Hの第2の形態においては、本明細書中で「サイトヒン - R (S T H - R) 」として言及され、この126番目のヌクレオチドはGであり、これは結果的に、S T Hタンパク質のこのS T H - Rアイソフォームの7番目の位置にてR (アルギニン) になっている。

【0018】

従って、本発明は、サイトヒン (S T H) 遺伝子、およびS T Hタンパク質をコード化する単離された核酸配列を提供する。該S T H遺伝子、およびS T Hタンパク質をコード化する該核酸配列は、S T H - QおよびS T H - R両方の対立遺伝子を包含する。該S T H遺伝子は「内因性」S T H遺伝子であってもよく、これは微生物内から天然に起源を発生し、または生じるものである。この遺伝子コードの変性により、本発明の該S T H遺伝子は、該S T H - QおよびS T H - R両方のアイソフォームを包含するS T Hタンパク質をもコード化するであろう複数の核酸置換物を包含する。本明細書中で使用されるように、「S T Hタンパク質」は、適切な場合、S T Hタンパク質 (S T H - QおよびS T H - R両方のアイソフォームを包含する) および「S T H類似体」両方を包含する。他に指し示されなければ、「タンパク質」は、タンパク質、タンパク質ドメイン、ポリペプチド、またはペプチドを意味するようにされる。「S T H類似体」は、該S T Hタンパク質とのアミノ酸配列の相同性において60%以上 (好ましくは70%以上) である該S T Hタンパク質に対する機能的類似性を持つ如何なるタンパク質であってもよい。

10

20

【0019】

本発明の核酸配列は、ゲノムDNA、cDNA、RNA、アンチセンスDNA、またはアンチセンスRNAであってもよく、如何なる種由来であってもよい。本発明の核酸配列は、好ましくは哺乳類の種由来であり、より好ましくはヒト由来である。

【0020】

本発明の核酸配列は、本明細書中で「サイトヒン - Q (S T H - Q) 」として言及されるS T HのQ対立遺伝子であってもよく、ここで126番目のヌクレオチドはAであり、これは結果的に、該S T H - Qタンパク質の7番目の位置にてQ (グルタミン) になる。該核酸配列が該S T H - Q対立遺伝子である場合、該核酸配列は、好ましくは図1のヌクレオチド配列 (これらの保存置換を包含する) を含む。「保存置換」は、本明細書中で使用されるように、この置換されたアミノ酸残基に機能的に等価であるアミノ酸置換であり、これは、それらが似た極性もしくは立体配置を持つからであるか、またはそれらがこの置換された残基と同じクラス (例えば、疎水的、酸性、または塩基性) に属するからである。本発明の核酸は、該S T Hタンパク質のS T H - Qアイソフォームをコード化してもよく、これは図3において説明されるアミノ酸配列を含む。

30

【0021】

本発明は更に、好ましくは高ストリンジェント条件下に (例えば、0.5 - MのNaHPO₄中65にて、フィルターと結合したDNAへのハイブリダイゼーション、および68にて0.1 x SSC / 0.1% SDS中での洗浄)、または中庸なストリンジェント条件下に (例えば、42にて0.2 x SSC / 0.1% SDS中での洗浄) (13)、図1において説明されるヌクレオチド配列もしくはこれの連続断片に相補的な第2の核酸へとハイブリダイゼーションする単離された核酸配列を提供する。加えて、本発明は、1つ以上の突然変異を持つ該S T Hタンパク質の該S T H - Qアイソフォームをコード化する核酸配列を提供し、ここで該突然変異は結果的に、非機能的 (本来の正常な機能を果たさない) もしくは突然変異タンパク質の発現、または全くの発現の欠落になる。該突然変異は、点突然変異、挿入突然変異、再配列、または欠損突然変異、あるいはこれらの組み合わせからなる群から選択される方法の少なくとも1つにより、生成されてもよい。

40

【0022】

本発明の核酸配列は、本明細書中で「サイトヒン - R (S T H - R) 」として言及される、S T HのR対立遺伝子であってもよく、ここで126番目のヌクレオチドはGであり

50

、これは結果的に、該 S T H タンパク質の該 S T H - R アイソフォームの 7 番目の位置にて、R (アルギニン)になる。該核酸配列が該 S T H - R 対立遺伝子である場合、該核酸配列は、好ましくは図 2 のヌクレオチド配列 (これらの保存置換を包含する)を含む。本発明の核酸は、該 S T H タンパク質の該 S T H - R アイソフォームをコード化してもよく、これは図 4 において説明されるアミノ酸配列を含む。

【0023】

本発明は更に、好ましくは高ストリンジェント条件下に (例えば、0.5 - M の Na H P O₄ 中 65 にて、フィルターと結合した DNA へのハイブリダイゼーション、および 68 にて 0.1 x S S C / 0.1 % S D S 中での洗浄)、または中庸なストリンジェント条件下に (例えば、42 にて 0.2 x S S C / 0.1 % S D S 中での洗浄) (2)、図 2 において説明されるヌクレオチド配列もしくはこれの連続断片に相補的な第 2 の核酸へとハイブリダイゼーションする単離された核酸配列を開示する。加えて、本発明は、1 つ以上の突然変異を持つ該 S T H タンパク質の該 S T H - R アイソフォームをコード化する核酸配列を提供し、ここで該突然変異は結果的に、非機能的もしくは突然変異タンパク質の発現、または全くの発現の欠落になる。該突然変異は、点突然変異、挿入突然変異、再配列、または欠損突然変異、あるいはこれらの組み合わせからなる群から選択される方法の少なくとも 1 つにより、生成されてもよい。

10

【0024】

本発明はまた、単離され精製された S T H タンパク質を提供する。該 S T H タンパク質は、被験者から得られた組織 (例えば、脳組織) から単離されてもよく、または以下に記載されるように組み換え的に産生されてもよい。該 S T H タンパク質は、本明細書中で開示される S T H - Q および S T H - R 両方のアイソフォームを包含する。

20

【0025】

本発明のタンパク質は、S T H タンパク質の Q アイソフォーム、すなわちサイトヒン - Q (S T H - Q) であってもよく、ここで 7 番目の位置に Q (グルタミン)がある。該タンパク質が該 S T H - Q アイソフォームである場合、該タンパク質は、好ましくは図 3 において説明されるアミノ酸配列を含む。あるいは、該 S T H タンパク質の該 S T H - Q アイソフォームは、図 1 において説明されるヌクレオチド配列によりコード化されてもよい。本発明は更に、高ストリンジェントまたは中庸なストリンジェント条件下に、図 1 において説明されるヌクレオチド配列もしくはこれの連続断片に相補的な第 2 の核酸配列へとハイブリダイゼーションする核酸配列によりコード化される精製されたタンパク質を指向するものである。

30

【0026】

本発明のタンパク質はまた、該 S T H タンパク質の該 R アイソフォーム、すなわちサイトヒン - R (S T H - R) であってもよく、ここで 7 番目の位置に R (アルギニン)がある。該タンパク質が該 S T H - R アイソフォームである場合、該タンパク質は、好ましくは図 4 において説明されるアミノ酸配列を含む。あるいは、該 S T H タンパク質の該 S T H - Q アイソフォームは、図 2 において説明されるヌクレオチド配列によりコード化されてもよい。本発明は更に、高ストリンジェントまたは中庸なストリンジェント条件下に、図 2 において説明されるヌクレオチド配列もしくはこれの連続断片に相補的な第 2 の核酸配列へとハイブリダイゼーションする核酸配列によりコード化される精製されたタンパク質を指向するものである。

40

【0027】

加えて、本発明は、該 S T H タンパク質の該 S T H - Q および S T H - R 両方のアイソフォームを包含する S T H タンパク質に結合する物質を提供する。該物質は、限定することなく、抗体、化合物、薬剤、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、分子、核酸、タンパク質 (成長因子を包含する)、ポリペプチド、ペプチド、核酸 (DNA、RNA、mRNA、アンチセンス RNA を包含する)、およびこれらの如何なる組み合わせをも包含してよい。更に、該 S T H - Q および S T H - R 両方のアイソフォームを包含する該 S T H タンパク質に結合する該物質は、天然物であっても、または合成物であってもよい。F a b 断

50

片は、抗体の1価の抗原結合断片であり、これはパパイン消化により産生される。F(a b')₂断片は、抗体の2価の抗原結合断片であり、これはペプシン消化により産生される。該STHタンパク質に結合する物質は、該タンパク質を興味ある物質と接触させること、および該タンパク質に結合する該物質の能力を査定することにより、同定またはスクリーニングされてもよい。

【0028】

本発明の該物質は、好ましくは、STHタンパク質に特異的またはSTHタンパク質と免疫反応性の抗体であり、該STH-Qおよび該STH-Rアイソフォームを包含する。本発明の該抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよく、当業者によく知られた技術により産生されてもよい。本発明の該抗体は、適切な標識系、バッファー、ならびに種々の検出および診断適用における使用のために必要な他の試薬を包含するキット中へ取り込まれてもよい。本発明の該抗体の標識化は、当業界において既知の種々の異なる化学蛍光剤および放射活性標識の内の1つを使用する、標準技術により達成されてもよい。

10

【0029】

本発明は更に、該STH-QおよびSTH-R両方のアイソフォームを包含する該STHタンパク質に特異的な抗体を産生する方法を提供し、これは：(a)哺乳類をSTHタンパク質(例えば、STH-QまたはSTH-R)で免疫し；(b)該哺乳類の組織から、または該哺乳類の組織を使用して作られたハイブリドーマから、抗体を精製する段階を含む。例えば、ポリクローナル抗体は、ウサギ、マウス、またはラットを精製されたSTH(例えば、STH-QまたはSTH-R)で免疫することにより産生されてもよい。この後、ウサギ、マウス、またはラットから脾臓を除去し、この脾臓の細胞を、骨髄腫細胞と融合し、ハイブリドーマを形成することにより産生されてもよく、このハイブリドーマは、培養されて成長される場合、モノクローナル抗体を産生するであろう。この方法により産生される抗体も提供される。

20

【0030】

本発明は更に、該STH-QおよびSTH-R両方の対立遺伝子を包含する、STHタンパク質をコード化する核酸に結合する物質を開示する。適切な物質は、限定されるものではないが、抗体、化合物、薬剤、Fab断片、F(a b')₂断片、分子、核酸、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸(DNA、RNA、mRNA、アンチセンスRNAを包含する)、およびこれらの如何なる組み合わせをも包含する。STHをコード化する該核酸に結合するこれらの物質は、該核酸の発現を阻害または促進することがある。このような物質は、STH(例えば、該STH-Q対立遺伝子、または該STH-R対立遺伝子)をコード化する核酸に結合する物質に関してスクリーニングする方法により発見されることがあり、この方法は、該核酸を興味ある物質と接触させること、および該核酸に結合する該物質の能力を査定することを含む。STHをコード化する核酸の該発現を阻害または促進する物質は、該核酸を含むベクターで形質転換された宿主細胞を接触させること、および該核酸の発現への該物質の効果を査定することにより、スクリーニングされてもよい。

30

【0031】

本発明はまた、該STH-QおよびSTH-R両方の対立遺伝子を包含する、STHタンパク質をコード化する核酸へとハイブリダイゼーションする核酸プローブおよびこれらの混合物を提供する。このようなプローブは、当業者には既知の種々の技術により調製されてよく、これらは限定なしに、PCR、およびSTH(例えば、該STH-Q対立遺伝子または該STH-R対立遺伝子)をコード化する核酸の制限酵素による消化；およびその配列が、Applied Biosystems Model 392 DNA/RNA合成機のような、市販のオリゴヌクレオチド合成機を使用する、STHをコード化する核酸のヌクレオチド配列の選択された位置に対応するオリゴヌクレオチドの、自動化された合成を包含する。本発明の核酸プローブはまた、それらが少なくとも1つの点、挿入、再配列、または欠損突然変異、あるいはこれらの組み合わせを含有し、このSTH遺伝子の突然変異に対応するよ

40

50

うに、調製されてもよい。

【0032】

本発明の該核酸プローブは、DNAまたはRNAであってよく、STH（例えば、該STH-Q対立遺伝子、または該STH-R対立遺伝子）をコード化する核酸の、約8ヌクレオチド～全長の長さにおいて変動してもよい。好ましくは、これらのプローブは、長さにおいて8～30ヌクレオチドである。核酸プローブの標識化は、当業界において既知の数多くの方法の内の1つを使用して達成されてもよく、これらは限定なしに、PCR、ニック（nick）翻訳、末端標識化、穴埋めの末端標識化、ポリヌクレオチド・キナーゼ交換反応、ランダム開始、またはSP6ポリメラーゼ（リボプローブ調製用）を包含し、ならびに、限定なしに、³⁵S、³²P、または³Hのような放射活性標識、およびビオチン、フルオレセイン（FITC）、アクリジン、コレステロール、またはカルボキシ-X-ローダミン（ROX）のような非放射活性標識を包含する種々の標識の内の1つを包含する。STHをコード化する核酸の異なる領域または重複する領域に対応する2つ以上の核プローブの組み合わせはまた、種々の検出および診断適用における使用のためのキット中に包含されてもよい。

10

【0033】

本発明は更に、STHタンパク質をコード化する核酸配列を含むベクターを指向するものである。STHタンパク質をコード化する該核酸配列は、例えば、該STH-Q対立遺伝子、または該STH-R対立遺伝子であってもよい。該ベクターの核酸配列が該STH-Q対立遺伝子である場合、該核酸配列は、図1のヌクレオチド配列またはこれらの連続断片を含んでもよい。あるいは、該ベクターの核酸配列は、図1において説明されるヌクレオチド配列に、またはこれらの連続断片に相補的な核酸配列に、高ストリンジェントまたは中庸なストリンジェント条件下にハイブリダイゼーションする核酸配列を含んでもよい。該ベクターの該核酸配列が該STH-R対立遺伝子である場合、該核酸配列は、図2のヌクレオチド配列またはこれらの連続断片を含んでもよい。あるいは、該ベクターの核酸配列は、図2において説明されるヌクレオチド配列またはこれらの連続断片に相補的な核酸配列に、高ストリンジェントまたは中庸なストリンジェント条件下にハイブリダイゼーションする核酸配列を含んでもよい。

20

【0034】

本発明の該ベクターは、以下に記載されるように、STHをコード化する核酸（例えば、該STH-Q、または該STH-R対立遺伝子）を、発現制御配列に操作されて結合された適切なベクター核酸中へ挿入することにより、構築されてもよい。この用語「挿入された」は、本明細書中で使用されるように、外来DNA断片のベクターDNAとの結合を意味し、これは、制限エンドヌクレアーゼによる消化により生成される、相容れる付着末端のアニール化のような技術により、または平滑末端結合技術の使用による。DNA分子を結合させる他の方法は、当業者には明らかであろう。

30

【0035】

本発明の該ベクターは、プラスミド、ウィルス由来核酸、ラムダファージ由来の溶菌バクテリオファージ、コスミド、またはM13のようなフィラメント状一本鎖バクテリオファージを包含する、数多くの異なる源由来であってよい。該ベクターが導入される宿主細胞の型に依って、ベクターは、バクテリア性または真核性であってもよい。バクテリア性ベクターは、プラスミドおよびファージのゲノムを包含する多くの源由来である。真核性ベクターは、数多くの異なる源、例えばイースト菌のプラスミドおよびウィルスから構築される。幾つかのベクターはシャトル・ベクターとして言及され、バクテリアおよび真核細胞の両方において、複製可能である。該ベクターが由来する該核酸は、大きさにおいて通常大きく抑制され、それでその自家複製に必須なそれらの遺伝子のみが残る。大きさにおけるこの抑制は、これらのベクターが、外来DNAの大きなセグメントに順応することを可能にする。STHをコード化する核酸（例えば、該STH-Q、または該STH-R対立遺伝子）が挿入され得る適切なベクターの例は、これらに限定されないが、pCGS、pBR322、pUC18、pUC19、pHSV-106、pJS97、pJS9

40

50

8、M13mp18、M13mp19、pSPORT1、pGem、pSPORT2、pSV・SPORT1、pBluescriptII、ZapII、gt10、gt11、gt22A、およびZIPLIXを包含する。他の適切なベクターは、当業者には明らかであろう。

【0036】

本発明の該ベクターは、宿主細胞中へ導入されてもよい。従って、本発明は更に、本発明の該ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。この用語「宿主細胞」は、本明細書中で使用されるように、該ベクターが導入されるバクテリア性または真核性の細胞を意味する。この用語「形質転換」は、ベクターの、バクテリア性または真核性の宿主細胞中への導入を記述する。加えて、本明細書中で使用されるように、この用語「導入」は、種々の手段の内の1つが、該核酸がその中で安定な形態で存在し、発現されることがあるような方法で、該ベクターが該宿主細胞の細胞内環境に入るようにするよう使用されて来たことを指し示す、一般的な用語である。このように、それは、バクテリア細胞の形質転換同様、真核細胞におけるトランスフェクション、トランスダクション、および関連方法を取り込む。本発明の該ベクターは、該宿主細胞内に、統合された形態で、または統合されていない形態で存在してよい。統合されていない形態である場合は、該ベクターは自家複製可能である。

10

【0037】

数多くの適切なバクテリア性または真核性宿主細胞のいずれの1つも、本発明の該ベクターで形質転換されてよい。適切な宿主細胞の例が当業者には既知であり、限定なしに、大腸菌株c600、c600hfl、HB101、LE392、Y1090、JM103、JM109、JM101、JM107、Y1088、Y1089、Y1090、Y1090(ZZ)、DM1、PH10B、DH11S、DH125、RR1、TB1、およびSURE、Bacillus subtilis、Agrobacterium tumefaciens、Bacillus megateriumのようなバクテリア細胞；Pichia pastoris、Chlamydomonas reinhardtii、Cryptococcus neoformans、Neurospora crassa、Podospora anserina、Saccharomyces cerevisiae、Saccharomyces pombe、Uncinula necatorのような真核細胞、培養昆虫細胞、培養鶏線維芽細胞、培養ハムスター細胞、HT1080、MCF7および143Bのような培養ヒト細胞、ならびにEL4およびNIH3T3細胞のような培養マウス細胞を包含する。

20

30

【0038】

幾つかのバクテリア性または真核性ベクターは、それらが該宿主細胞内での高レベルに至る挿入された核酸を発現させることが出来るように、操作されている。「発現力セット」または「発現制御配列」は、操作されて結合された、または転写および翻訳制御要素（例えば、プロモーター、リボゾーム結合部位、オペレーター、またはエンハンサー）の制御下のSTHタンパク質（例えば、該STH-Q、または該STH-R対立遺伝子）をコード化する核酸を含み、in vitroまたはin vivoにおいて、STHタンパク質（例えば、該STH-Q、または該STH-Rアイソフォーム）の発現用に作られて使用され得る。本明細書中で使用されるように、「発現」は、該ベクターの、この挿入された核酸をmRNAへと転写する能力に関し、それでこの挿入された核酸によりコード化されるタンパク質の合成が起こり得る。用いられる制御要素の選択は、形質転換されるべき該宿主細胞および望まれるレベルの発現のような因子に依って、変動することがある。

40

【0039】

例えば、大腸菌のようなバクテリア性宿主細胞での遺伝子の発現用に使用されるベクターにおいては、lacオペレーター-プロモーターまたはtacプロモーターがしばしば使用される。真核性ベクターは、ウィルス性遺伝子のプロモーター-エンハンサー配列、特に腫瘍ウィルスのそれらを使用する。哺乳類細胞における使用のための幾つかのプロモーターは、当業界において既知である。これらのプロモーターの例は、限定なしに、ホス

50

ホグリセレート (P G K) プロモーター、サル・ウィルス 4 0 (S V 4 0) 早期プロモーター、鶏 (R o u s) サルコーマ・ウィルス (R S V) プロモーター、アデノウィルス主要後期プロモーター (M L P)、およびヒト・サイトメガロウィルス (C M V) 直早期 1 プロモーターを包含する。しかしながら、適切な発現レベルを容易にする如何なるプロモーターも、本発明において使用され得る。誘導可能なプロモーター (例えば、限定なしに、大腸菌中の該 l a c オペレーター - プロモーター、および真核細胞中のメタロチオニンまたはマウス哺乳類腫瘍ウィルスプロモーターを包含する熱ショック遺伝子、メタロチオニン遺伝子、ベーター - インターフェロン遺伝子、またはステロイド・ホルモン応答遺伝子から得られるもの) は、外因性の刺激に基づいて、転写を制御するのに有用であることがある。

10

【 0 0 4 0 】

S T H をコード化する核酸 (例えば、該 S T H - Q、または該 S T H - R 対立遺伝子) の、宿主細胞における発現に適したベクターは、当業者にはよく知られており、 p E T - 3 d (N o v a g e n)、p P r o E x - 1 (L i f e T e c h n o l o g i e s)、p F a s t B a c 1 (L i f e T e c h n o l o g i e s)、p S F V (L i f e T e c h n o l o g i e s)、p c D N A I I (I n v i t r o g e n)、p S L 3 0 1 (I n v i t r o g e n)、p S E 2 8 0 (I n v i t r o g e n)、p S E 3 8 0 (I n v i t r o g e n)、p S E 4 2 0 (I n v i t r o g e n)、p T r c H i s A , B , C (I n v i t r o g e n)、p R S E T A , B , C (I n v i t r o g e n)、p Y E S 2 (I n v i t r o g e n)、p A C 3 6 0 (I n v i t r o g e n)、p V L 1 3 9 2 および p V l 1 3 9 2 (I n v i t r o g e n)、p C D M 8 (I n v i t r o g e n)、p c D N A I (I n v i t r o g e n)、p c D N A I (a m p) (I n v i t r o g e n)、p Z e o S V (I n v i t r o g e n)、p c D N A 3 (I n v i t r o g e n)、p R c / C M V (I n v i t r o g e n)、p R c / R S V (I n v i t r o g e n)、p R E P 4 (I n v i t r o g e n)、p R E P 7 (I n v i t r o g e n)、p R E P 8 (I n v i t r o g e n)、p R E P 9 (I n v i t r o g e n)、p R E P 1 0 (I n v i t r o g e n)、p C E P 4 (I n v i t r o g e n)、p E B V H i s (I n v i t r o g e n)、および P o p 6 を包含する。他のベクターは、当業者には明らかであろう。

20

【 0 0 4 1 】

本発明の該ベクターは、当業界において既知の従来手順を使用して、宿主細胞中へ導入されてもよく、これは限定なしに、電気穿孔法、D E A E デキストラン・トランスフェクション、リン酸カルシウム・トランスフェクション、モノカチオン性リポソーム融合、ポリカチオン性リポソーム融合、原形質融合、i n v i v o における電場の創出、DNA 被覆マイクロ噴出性衝撃、組み換え複製 - 欠損ウィルスを用いた注入、相同的組み換え、i n v i v o 遺伝子治療、e x v i v o 遺伝子治療、ウィルス性ベクター、およびむき出しの DNA の移入、あるいはこれらの如何なる組み合わせをも包含する。宿主細胞、組織、または被験者中への遺伝子移入の目的では、S T H (例えば、該 S T H - Q、または該 S T H - R 対立遺伝子) をコード化する核酸を含有する組み換えベクターは、好ましくはこの受容者の血液と等張である無菌水溶液と組み合わせられてもよい。このような製剤は、この組み換えベクターを、塩化ナトリウム、グリシン、および同様のもののような生理学的に相容れる物質を含有する水中に懸濁させ、生理学的条件と相容れる緩衝化された pH を持たせて水溶液を生産し、その後この溶液を無菌にすることにより、調製されてもよい。本発明の好ましい実施形態において、該組み換えベクターは、哺乳類中への導入のための調製において、生理食塩水溶液中 2 0 ~ 2 5 % のスクロースと組み合わせられる。

30

40

【 0 0 4 2 】

本発明は更に、組み換え S T H タンパク質を作る方法を提供し、これは： (a) 適切なバクテリア性または真核性宿主細胞中へ、S T H をコード化する核酸配列 (例えば、該 S T H - Q、または該 S T H - R 対立遺伝子)、あるいは図 1 において説明されるヌクレオチド配列またはこれらの連続断片に相補的な第 2 の核酸に、高ストリンジェント条件また

50

は中庸なストリンジェント条件下にハイブリダイゼーションする核酸、あるいは図2において説明されるヌクレオチド配列またはこれらの連続断片に相補的な第2の核酸に、高ストリンジェント条件または中庸なストリンジェント条件下にハイブリダイゼーションする核酸を導入し；(b)該核酸配列が発現されて、S T Hタンパク質(例えば、該S T H-Qアイソフォーム、または該S T H-Rアイソフォーム)を産生するような条件下に該宿主細胞を維持し；および(c)この組み換えS T Hタンパク質を、この培養培地から、該宿主細胞から、または細胞溶解物から回収する段階を含む。本明細書中で使用されるように、この用語「組み換え」は、その発現を高レベルへと向けることが出来るベクターで形質転換された宿主細胞からの精製により産生されるS T Hタンパク質(例えば、該S T H-Qアイソフォーム、または該S T H-Rアイソフォーム)に関する。本発明の方法において、S T Hをコード化する核酸配列(例えば、該S T H-Q対立遺伝子、または該S T H-R対立遺伝子)が、前記方法のいずれかにより、適切な宿主細胞中へと導入されてもよい。

10

【0043】

ベクターで形質転換された宿主細胞を成長させる種々の方法が、当業者に知られている。宿主細胞の型(例えば、バクテリア性、または真核性)は、利用されるべき方法、ならびに、温度、痕跡量の栄養分、湿度、および成長時間のような要因に関する特異的なパラメーターの最適化両方の、まず最初の決定因子である。使用されるベクターに依って、これらの宿主細胞は、該ベクター中に含有される核酸の発現を開始させるために、その成長サイクル中のある点における特異的な化合物の添加により誘導されなくてはならないことがある。該ベクター中に含有される該核酸の発現を誘導するために使用される化合物の例は、当業者には既知であり、限定なしに、IPTG、亜鉛、およびデキサメタゾンを含む。硫酸アンモニウムによる沈殿および引き続いての塩を除去するための透析のような、タンパク質の単離および精製の標準方法を使用し、その後大きさ、特定のpH値における該タンパク質の電荷、親和性による方法等に従って分画して、組み換えS T H(例えば、該S T H-Qアイソフォーム、または該S T H-Rアイソフォーム)は、S T Hをコード化する核酸(例えば、該S T H-Q対立遺伝子、または該S T H-R対立遺伝子)を発現できるベクターで形質転換された適切な宿主細胞から抽出されてもよい。

20

【0044】

ゲノムが該S T H遺伝子における分断を含む遺伝子導入非ヒト動物、またはS T Hタンパク質(例えば、該S T H-QまたはS T H-Rアイソフォーム)を過剰に発現する遺伝子導入非ヒト動物を提供することも、本発明の範囲内である。該S T H遺伝子は、非ヒト動物、特にマウスに存在することが知られている。該非ヒト動物は、如何なる適切な動物(例えば、ネコ、ウシ、イヌ、ウマ、ヤギ、齧歯類、およびヒツジ)であってもよいが、好ましくは齧歯類である。より好ましくは、該非ヒト動物は、ラットまたはマウスである。本発明の遺伝子導入非ヒト動物は、当業界において知られているものを包含する種々の、遺伝子導入動物を遺伝子工学的に操作する技術により産生されてもよい。

30

【0045】

本明細書中で使用されるように、この用語「遺伝子導入非ヒト動物」は、遺伝子工学的に操作された非ヒト動物に関し、これは実験操作により生産され、このゲノムは、導入遺伝子の導入により代えられている。本明細書中で更に使用されるように、この用語「導入遺伝子」は、実験操作により動物の該ゲノム中へ導入された核酸(例えば、DNA、すなわち遺伝子)に関し、ここでこの導入された遺伝子は、該動物にとって内因性ではなく、または、該動物にとって内因性である遺伝子の修飾もしくは突然変異された形態である。内因性遺伝子のこの修飾もしくは突然変異された形態は、ヒトの介入を通じて(例えば、点突然変異の導入、フレームシフト突然変異の導入、この内因性遺伝子の一部分または断片の欠損、選択可能なマーカー遺伝子の挿入、終結コドンの挿入等により)産生されてもよい。遺伝子導入非ヒト動物は、限定なしに、導入遺伝子の、胚幹細胞、新たに受精された卵、または非ヒト動物の早期胚への導入を含むヒトの介入；導入遺伝子の、非ヒト動物の体細胞および/または生殖細胞の染色体への統合；および本明細書中で記載される方法

40

50

のいずれかを含む幾つかの方法により産生されてもよい。

【0046】

1つの実施形態では、本発明の該遺伝子導入動物は、該STH遺伝子が選択的に不活性化されていて、結果的にその内因性STH遺伝子中での分断になるゲノムを持っている。本明細書中で使用されるように、「分断(disruption)」は、該STH遺伝子における突然変異(すなわち、遺伝子材料における永久的、伝播可能な変化)に関し、これは、機能的なSTHタンパク質の正常な発現を妨げる(例えば、それは結果的に、突然変異STHタンパク質の発現になる;それは正常量のSTHタンパク質の発現を妨げる;または、それはSTHタンパク質の発現を妨げる)。分断の例は、限定なしに、点突然変異、フレームシフト突然変異の導入、該内因性遺伝子の一部分もしくは断片の欠損、選択可能なマーカー遺伝子の挿入、および終結コドンの挿入を包含する。本明細書中で使用されるように、この用語「突然変異」は本明細書中で使用されて、その野生型遺伝子(またはその遺伝子産物)と比較して、その配列(またはその機能特性)における少なくとも1つの修飾を呈する遺伝子(またはその遺伝子産物)に関する。対照的に、この用語「野生型」は、その天然源において(例えば、天然の集団において)最も頻繁に見出されるような、特定の遺伝子(またはその遺伝子産物)に関する特徴的な遺伝子型(または表現型)に関する。野生型動物は例えば、機能的なSTHを発現する。

10

【0047】

本発明の該遺伝子導入非ヒト動物における選択的不活性化は、種々の方法により達成されてもよく、結果的に、異種接合分断(ここで、結果的に得られる遺伝子導入動物がこの突然変異に関して異種接合であるように、1つのSTH遺伝子の対立遺伝子(例えば、該STH-Q対立遺伝子、または該STH-R対立遺伝子)が分断される)または同種接合分断(ここで、結果的に得られる遺伝子導入動物がこの突然変異に関して同種接合であるように、両方のSTH対立遺伝子-STH-QおよびSTH-R-が分断される)となってもよい。

20

【0048】

本発明の1つの実施形態では、該遺伝子導入動物の該内因性STH遺伝子は、STH遺伝子産物に共通な領域をコード化する核酸配列との相同的な組み換えを通じて分断される。例としては、相同的な組み換えを通じての該分断は、該STH遺伝子におけるノックアウト突然変異、特に、少なくとも1つの欠損が、該STH遺伝子の少なくとも1つのエクソンにて導入されているノックアウト突然変異を発生することがある。加えて、該STH遺伝子における分断は、異種の選択可能なマーカー遺伝子の、該内因性STH遺伝子中への挿入から結果的に得られることがある。

30

【0049】

そのSTH遺伝子中にノックアウト突然変異を持つ遺伝子導入非ヒト動物を創出する方法は、以下の段階:

(a) STHを標的とするベクターを生成し;

(b) このSTHを標的とするベクターを、非ヒト動物の受容細胞中へ導入して、処理された受容細胞を産生し;

(c) この処理された受容細胞を、非ヒト動物の芽細胞中へ導入して、処理された芽細胞を産生し;

40

(d) この処理された芽細胞を、偽妊娠非ヒト動物中へ導入し;

(e) この移植された芽細胞を、発達が終結するようにさせ;

(f) ゲノムがその内因性STH遺伝子中にノックアウト分断を含む遺伝子導入非ヒト動物を同定し;および

(g) 該遺伝子導入非ヒト動物を育てて、野生型に比べて抑制されたSTHタンパク質発現を呈する遺伝子導入非ヒト動物を得る

段階を含んでもよい。

【0050】

STH(例えば、該STH-Qアイソフォーム、または該STH-Rアイソフォーム)

50

を過剰に発現する遺伝子導入非ヒト動物を提供することも、本発明の範囲内である。該非ヒト動物は、適切な如何なる動物（例えば、ネコ、ウシ、イヌ、ウマ、ヤギ、齧歯類、およびヒツジ）であってもよいが、好ましくは齧歯類である。より好ましくは、該非ヒト動物は、ラットまたはマウスである。本発明の該遺伝子導入非ヒト動物は、当業界において既知のものを包含する、遺伝子導入動物を遺伝子工学的に操作する種々の技術により、生産されてもよい。例えば、該遺伝子導入動物は、限定なしに、導入遺伝子の胚幹細胞、新たに受精された卵、または非ヒト動物の早期胚への導入を包含するヒトの介在；導入遺伝子の、非ヒト動物の体細胞および/または生殖細胞の染色体中への統合；および本明細書中で記載される方法のいずれかを含む幾つかの方法により生産されてもよい。

【0051】

10

本発明の該遺伝子導入動物（例えば、ゲノムが該STH遺伝子における分断を含む遺伝子導入非ヒト動物、およびSTH-QまたはSTH-Rを過剰に発現する遺伝子導入非ヒト動物）が生産された後、各々が解析されて、この導入遺伝子が結果的に病理（例えば、神経炎斑の蓄積、または神経繊維の絡み合い）をもたらすかどうか決定してもよい。病理が該動物において進展しなければ、該遺伝子導入動物は、病理（例えば、神経炎斑の蓄積、または神経繊維の絡み合い）を進展させる他の遺伝子導入動物と交配され、該導入遺伝子の存在が、問題となっている該病理を加速させるかどうかを決定してもよい。例えば、本発明者らは、STHタンパク質の該STH-Rアイソフォームが、神経炎斑および神経繊維の絡み合いのような病理を加速することに対して応答性であると信じている。

【0052】

20

本発明はまた、被験者が神経変性疾患を持っているかもしくは持っていた（剖検の場合）か、または神経変性疾患を進展させるリスクが上昇しているかどうかを決定する方法も提供する。本明細書中で使用されるように、この「被験者」は、限定なしに、ウシ、イヌ、ヒト、サル、マウス、ブタ、またはラットを包含する哺乳類（生存しているか、または死亡した）であるが、好ましくはヒトである。神経変性疾患の例は、限定なしに、アルツハイマー病、筋萎縮側硬化症（Lou Gehrig病）、Binswanger病、皮質基底変性（CBD）、区別可能な組織病理を欠く痴呆（DLDH）、前頭葉痴呆（FTD）、ハンチントン舞蹈病、多発性硬化症、重症筋無力症、パーキンソン病、ピック（Pick）病、および進行性核上麻痺（PSP）を包含する。本発明の方法において、該神経変性疾患は、好ましくはアルツハイマー病（AD）である。

30

【0053】

本明細書中で開示されるように、このSTH-Rの遺伝子型は、アルツハイマー病を進展させる増大したリスクと関連している。この同種接合STH-R遺伝子型は、ADを進展させる最も高い可能性と関連している。これ故に、被験者の診断サンプル中での該STH-R対立遺伝子の存在の検出は、該被験者が神経変性疾患（例えばAD）を持っているか、もしくは神経変性疾患（例えばAD）を持っていたか（剖検の場合）、または神経変性疾患（例えばAD）を進展させるリスクが上昇していることを指し示すものである。

【0054】

従って、本発明の方法は、該サイトヒン（STH）遺伝子の1つ以上の対立遺伝子の存在に関して、該被験者の診断サンプルをアッセイすることを含み、ここで該STH-R対立遺伝子の存在の検出は、該被験者が神経変性疾患（例えばAD）を持っているか、もしくは神経変性疾患（例えばAD）を持っていたか（剖検の場合）、または神経変性疾患（例えばAD）を進展させるリスクが上昇していることを指し示すものである。本明細書中で使用されるように、この文言「神経変性疾患を進展させるリスクが増大している」は、神経変性疾患への素地を与えられる/与えられた被験者、神経変性疾患に対しての遺伝子的なかかりやすさを持っている/持っていた被験者、または該STH遺伝子の該STH-R対立遺伝子が存在していない被験者（すなわち、STH-Qに関して同種接合の被験者）よりも、神経変性疾患をより進展させやすい/させやすかった被験者に関する。本発明の好ましい実施形態では、本明細書中で記載される方法は、被験者がADを持っているかもしくはADを持っていたか（剖検の場合）、またはADを進展させるリスクが上昇して

40

50

いるかを決定するために使用され、該 S T H - R 対立遺伝子の存在の検出は、該被験者が A D を持っている（もしくは A D を持っていた）か、または A D を進展させるリスクが増大していることを指し示すものである。1つの実施形態では、該 A D は後発性 A D（L O A D）である。

【0055】

被験者の診断サンプル中の S T H - R の存在に関するスクリーニングは、被験者が A D を持っているかもしくは A D を持っていた（剖検の場合）か、または A D を進展させるリスクが増大しているかを決定する、非侵襲性的の方法を与える。本発明の方法は単独で、または A D のリスク要因（例えば、A p o E 4）に関する他のスクリーニング（例えば、米国特許第 5, 7 1 6, 8 2 8 号、米国特許第 5, 7 6 7, 2 4 8 号、および米国特許第 6, 1 3 6, 5 3 0 号参照）に加えて使用されてもよいことが、考えられる。

【0056】

本発明の方法によれば、被験者の診断サンプルは、in vitro または in vivo でアッセイされてよい。本発明によれば、該アッセイが in vitro で行われる場合、該被験者からの診断サンプルは、標準的な手順を使用して除去されてもよい。該診断サンプルは、組織、特に如何なる脳組織、腎組織、筋組織、神経組織、網膜組織、または軟組織であってもよく、これらは標準的な生検により除去されてもよい。加えて、該診断サンプルは、血液、髄液、心膜液、腹膜液、唾液、血清、および尿を包含する体液であってもよい。好ましい実施形態では、該診断サンプルは血液である。該診断サンプルは、例えば神経変性疾患（例えば A D）を持っていることを疑われる被験者もしくは患者、神経変性疾患（例えば A D）を持っていることが分からない被験者もしくは患者、家族が神経変性疾患（例えば A D）の経歴を持っている被験者もしくは患者、認知の衰えを呈する被験者もしくは患者、および年老いた被験者もしくは患者から採取されてもよい。

【0057】

本発明の方法では、被験者の診断サンプルは、限定なしに、免疫学的技術、該被験者から採取された該診断サンプルから抽出された核酸（例えば、ゲノム D N A）のハイブリダイゼーション解析、蛍光画像化技術、放射能検出、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション（P C R）、リガーゼ・チェーン・リアクション（L C R）、R I A アッセイ、および E L I S A アッセイを包含する既知の技術から容易に決定されるアッセイおよび検出方法を使用して、該 S T H 遺伝子の1つ以上の対立遺伝子（例えば、該 S T H - Q 対立遺伝子、または該 S T H - R 対立遺伝子）の存在に関してアッセイされてもよい。

【0058】

核酸は、当業者に既知の標準的な技術を使用して、被験者の診断サンプルから単離されてもよい。単離された核酸は、限定なしに、リガーゼ・チェーン・リアクション（L C R）（21）およびポリメラーゼ・チェーン・リアクション（P C R）（例えば、米国特許第 4, 6 8 3, 1 9 5 号；米国特許第 4, 6 8 3, 2 0 2 号；米国特許第 4, 8 0 0, 1 5 9 号；および米国特許第 4, 9 6 5, 1 8 8 号参照）を包含する当業界において既知の手順により増幅されてもよい。例えば、本発明の方法において、該 S T H 遺伝子の一部または全部をコード化するゲノム D N A は、被験者の診断サンプルから単離され、本明細書中で開示されているもののような、S T H に特異的もしくは S T H 領域特異的オリゴヌクレオチド・プライマーの少なくとも1対を使用して、増幅されてもよい。これにより生成されるこの増幅された D N A はその後、本明細書中で開示されている如何なるものをも包含する、該 S T H 領域に特異的な部位にて D N A を開裂させて消化物を形成出来る制限酵素と共にインキュベートされてもよい。この後、該消化物中の D N A 断片の大きさが決定されてもよい。該 S T H - R 対立遺伝子を欠くコントロールのサンプル中の D N A 断片の大きさと異なる大きさを持つ D N A 断片の存在は、該被験者の該診断サンプルにおける該 S T H - R 対立遺伝子の存在を指し示す。

【0059】

本発明のこの方法によれば、前記ハイブリダイゼーション解析は、m R N A のノーザン・プロット解析を使用して遂行されてもよい。加えて、本発明のこの方法は、S T H をコ

ード化する核酸（例えば、該 S T H - Q 対立遺伝子、または該 S T H - R 対立遺伝子）へとハイブリダイゼーションする 1 つ以上の核酸プローブを使用して、DNA のサザン・ブロット解析を行うことにより遂行されてもよい。該核酸プローブは、当業者には既知の種々の技術により調製されてもよく、これらは、限定なしに、以下を包含する：S T H タンパク質をコード化する核酸の制限酵素による消化；Applied Biosystems Model 392 DNA/RNA 合成機のような、市販のオリゴヌクレオチド合成機を使用する、該 S T H 遺伝子のヌクレオチド配列の選択された部分に対応する配列を持つオリゴヌクレオチドの、自動化された合成；および本明細書中で開示される全ての方法。

【0060】

該プローブにおいて使用される S T H 核酸は、哺乳類、好ましくはヒトの S T H 由来であってもよい。本発明の方法において使用される核酸プローブは、DNA もしくは RNA であってもよく、該 S T H 核酸の約 8 ヌクレオチド～全長の長さで変動してもよい。加えて、該プローブは、前記のプローブ調製方法に従って調製されてもよい。更に、本発明の該核酸プローブは、1 つ以上の検出可能なマーカーで標識されてもよい。該核酸プローブの標識化は、前記のものを包含する種々の標識の内の 1 つを用いて、前記のものを包含する、当業界において既知の数多くの方法の内の 1 つを使用して達成されてもよい。該 S T H 核酸の異なるかもしくは重複する領域に対応する 2 つ以上の核酸プローブ（もしくはプライマー）の組み合わせも、例えば PCR もしくは RT - PCR を使用して、S T H の発現に関して診断サンプルをアッセイするのに使用されてもよい。

【0061】

本明細書中で開示されるように、該 S T H の該 S T H - R アイソフォームの存在は、A D を進展させるリスクを上昇させるように思われる。これ故に、遺伝子型を分類することは、被験者の組織または体液中に存在する該 S T H タンパク質の直接の試験によっても可能である。従って、本発明の方法では、被験者の診断サンプルもまた、該 S T H タンパク質の 1 つ以上のアイソフォーム（例えば、該 S T H - Q アイソフォーム、および該 S T H - R アイソフォーム）の発現に関してアッセイすることにより、該 S T H 遺伝子の 1 つ以上の対立遺伝子の存在に関してアッセイされてもよい。本明細書中で使用されるように、「発現」は、前記で定義されたような、該 S T H 遺伝子の少なくとも 1 つの mRNA 転写物への転写、または少なくとも 1 つの mRNA の S T H タンパク質への翻訳を意味する。従って、診断サンプルは、S T H タンパク質（前記で定義されたような）、S T H の c D N A、または S T H の mRNA に関してアッセイすることにより、S T H の発現に関してアッセイされてもよい。S T H の適切な形態は、本明細書中で議論される特定の技術に基づき、明らかであろう。

【0062】

タンパク質は、限定なしに、組織からの抽出（例えば、該タンパク質を可溶化する洗剤を用いて）（必要な場合には、カラムでの親和性による精製を伴って）、クロマトグラフィー（例えば、F T L C および H P L C）、免疫沈降（S T H に特異的な抗体を用いて）、および沈降（例えば、イソプロパノール、およびトリゾール（Trizol）のような試薬を用いて）を包含する、当業界において既知の標準的な方法を使用して、本発明の診断サンプルから単離および精製されてもよい。該タンパク質の単離および精製は、電気泳動（例えば、S D S - ポリアクリルアミドゲル上の）に伴われてもよい。

【0063】

本発明の方法によれば、被験者の診断サンプルは、S T H の発現に関してアッセイされてもよく、S T H の発現は、限定なしに、免疫学的技術、ハイブリダイゼーション解析、蛍光画像化技術、放射能検出、PCR、LCR、RIA アッセイ、および ELISA アッセイを包含する、既知の技術から容易に決定されるアッセイおよび検出方法を使用して、診断サンプル中で検出されてもよい。例えば、本発明の方法により、該被験者の診断サンプルは、S T H と反応性の物質を使用して、S T H の発現に関してアッセイされてもよい。本明細書中で使用されるように、「反応性」とは、該物質が S T H に関しての親和性を持つか、S T H に結合するか、または S T H に対して向けられたものであることを意味す

10

20

30

40

50

る。本明細書中で更に使用されるように、「物質」は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸（DNAまたはRNAを包含する）、抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、分子、化合物、抗生物質、薬剤、前記で開示された物質のいずれか、およびこれらの如何なる組み合わせをも包含するようにされる。好ましくは、本発明の該物質は、検出可能なマーカーで標識される。

【0064】

本発明の1つの実施形態においては、STHと反応性の該物質は、対立遺伝子に特異的な（例えば、該STH-Q対立遺伝子に特異的な、または該STH-R対立遺伝子に特異的な）抗体である。本明細書中で使用されるように、本発明の該抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであってもよい。加えて、本発明の該抗体は、前記のもの 10
のいずれをも包含する、当業者にはよく知られた技術により産生されてもよい。本明細書中で使用されるこれらの抗体は、検出可能なマーカーで標識されてもよい。抗体の標識化は、当業界では既知のもの、および前記のものを包含する、種々の標識化技術の内の1つを使用して達成されてもよい。本発明のこの検出可能なマーカーは、如何なる前記の検出可能なマーカーと同様、当業界において既知のもの 10
のいずれであってもよい。好ましくは、本発明の該物質は、検出可能なマーカーで標識された高親和性抗体である。

【0065】

本発明の該物質がSTHと反応性の抗体である場合、該被験者から採取された診断サンプルは、ビーズ、ゲル、またはプレートの形態の不溶性有機ポリマーのような固体の支持体に付着されたりガンドとしてSTH抗体を含有する親和性カラム（アフィニティー・カラム）を通過させることにより精製されてもよい。この固体の支持体に付着された該抗体は、カラムの形態で使用されてもよい。適切な固体の支持体の例は、限定なしに、アガロース、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、セファロース、または他の不溶性有機ポリマーを包含する。該STH抗体は、もし望まれる場合には、スパーサー分子を介してこの固体の支持体に更に付着されてもよい。適切な結合条件（例えば、温度、pH、および塩濃度）は、当業者によって容易に決定されてよい。1つの実施形態では、該STH抗体は、Sepharose（セファロース）4Bのようなセファロースカラムに付着される。

【0066】

該物質が抗体である場合は、該被験者の診断サンプルは、標準的な免疫学的検出技術を用いて、STHと免疫反応性の1つ以上の抗体を利用する結合研究（バインディング・スタディ）を使用して、STH発現に関してアッセイされてもよい。例えば、該親和性カラムから溶出される該STHタンパク質は、ELISAアッセイ、RIAアッセイ、ウェスタン・ブロット解析、フロー・サイトメトリー、または抗原-抗体相互作用を用いる他の如何なる免疫染色方法に付されてもよい。本発明の好ましい実施形態では、該診断サンプルは、ELISAアッセイを使用して、STH発現に関してアッセイされる。

【0067】

本発明の方法に従って、被験者の診断サンプル中のSTHの1つ以上の対立遺伝子の存在の検出は、該被験者の該診断サンプル中に存在するSTH-QおよびSTH-Rの相対量および合計量を測定もしくは定量するためのアッセイを伴ってもよい。このようなアッセイは当業者にはよく知られており、免疫組織化学/免疫細胞化学、フロー・サイトメトリー、質量分析、ウェスタン・ブロット解析、またはSTHタンパク質の量を測定するためのELISAを包含してもよい。例えば、免疫組織化学アッセイを使用するために、組織の組織学的（パラフィンに包埋された）切片がスライド上に置かれてもよく、その後STHに対する抗体と共にインキュベートされてもよい。該スライドはその後（1次抗体に対して）2次抗体と共にインキュベートされてもよく、これは、染料または他の染色系（例えば、蛍光色素、放射性物質、または高電子走査容量を持つ物質）に対して、該切片中に存在するSTHの視覚化を可能にするために取り付けられる。

【0068】

本発明中の該診断サンプルはしばしば、該被験者もしくは患者によってではなく、また

10

20

30

40

50

その担当医師によってでもないが、実験室の技術者もしくは他の臨床家によって、S T H 発現に関してアッセイされるであろうと考えられる。従って、本発明の方法は更に、被験者もしくは患者の担当医師に、S T H の 1 つ以上の対立遺伝子の存在に関する該被験者もしくは患者の診断サンプルのアッセイ時に得られる結果の報告を提供することを含む。

【0069】

本明細書中で開示されるように、該 S T H 遺伝子の 2 つの既知の対立遺伝子 (S T H - Q および S T H - R) が、ヒト集団には存在する。これ故に、3 つの可能な遺伝子型がある：(1) S T H - Q に関して同種接合のもの、つまり Q Q ; (2) S T H - R に関して同種接合のもの、つまり R R ; および (3) Q R と略される、S T H - Q の 1 つのコピーおよび S T H - R の 1 つのコピーを持つ異種接合のもの。本発明者らは、被験者中の該 S T H - R 遺伝子型の存在およびアルツハイマー病を進展させる該被験者のリスクの間に相関が存在することを見出している。特に、単一の S T H - R 対立遺伝子の存在は (すなわち、該被験者は S T H - R に関して異種接合、つまり Q R である)、A D を進展させるリスクの増大と関連している一方、2 つの S T H - R 対立遺伝子の存在は (すなわち、該被験者は S T H - R に関して同種接合、つまり R R である)、A D を進展させる最も高いリスクと関連している。

10

【0070】

前記の観点から、本発明では、S T H の 1 つ以上の対立遺伝子の存在に関して、被験者の診断サンプルをアッセイすることは、神経変性疾患 (例えば A D) を持っているかもしくは進展させるかも知れない被験者もしくは患者の予後に関する情報を提供する有用な方法であることがあるとも考えられる。従って、本発明は更に、神経変性疾患を持っている被験者、または神経変性疾患を進展させるかも知れない被験者の予後を査定する方法を提供し、該方法は、S T H の 1 つ以上の対立遺伝子の存在に関して該被験者の診断サンプルをアッセイすることを含み、ここで該被験者の該診断サンプル中の 2 つの S T H - R 対立遺伝子の存在は、該被験者に関して、よりな予後を指し示す。

20

【0071】

本発明の方法によれば、該神経変性疾患は、アルツハイマー病 (A D) を包含する、前記のものの中のいずれであってもよい。好ましい実施形態では、該神経変性疾患は A D である。1 つのこのような好ましい実施形態では、該 A D は後発性 A D (L O A D) である。該被験者の該診断サンプルは、前記のような組織または体液であってもよく、前で議論されたものを包含する既知の手順によって、該被験者から除去されてもよい。1 つの実施形態では、該診断サンプルは血液サンプルである。加えて、該診断サンプルは、前記の種々のアッセイ、検出方法、および定量方法の全てを使用して、i n v i t r o または i n v i v o でアッセイされてもよい。更に、被験者もしくは患者の該診断サンプルがアッセイされ、S T H の 1 つ以上の対立遺伝子の存在が決定されてもよく、これは、該被験者もしくは患者が神経変性疾患 (例えば A D) を持っているか、または神経変性疾患 (例えば A D) を進展させるリスクが増大しているというこの決定の前、間、または後の如何なる時であってもよい。

30

【0072】

本発明の該診断サンプルは、該被験者もしくは患者によってではなく、その担当医師によってでもないが、実験室技術者もしくは他の臨床家によって、S T H の 1 つ以上の対立遺伝子の存在に関してしばしばアッセイされるであろうと考えられる。従って、本発明の方法は更に、被験者もしくは患者の担当医師に、S T H の 1 つ以上の対立遺伝子の存在に関して、該被験者もしくは患者の診断サンプルをアッセイする際に得られた結果の報告を提供することを含む。

40

【0073】

本発明者らの生化学的成果は、該 S T H タンパク質の該 S T H - R アイソフォームが、該 S T H - Q アイソフォームが蓄積するよりも、脳中に更に蓄積することを示した。これ故に、上昇したレベルの S T H の検出は、該 S T H - R 遺伝子型の存在を指し示しているように思われる。該 S T H タンパク質の該 S T H - R アイソフォームは脳および恐らく他

50

の組織中に蓄積するので、この蓄積が髄液および血液中での上昇したレベルにより反映されるであろうと予期することは合理的である。従って、A Dの進展の上昇したリスクの検出は、被験者の診断サンプルにおけるS T Hタンパク質のレベルの測定のみを単に要求してもよい。S T Hタンパク質の上昇したレベルはその後、該被験者における該S T H - R対立遺伝子配列の少なくとも1つのコピーの存在を指し示すものとなるであろう。

【0074】

前記の観点から、被験者がアルツハイマー病(A D)を持っているかもしくはA Dを持っていたか(剖検の場合)、またはA Dを進展させるリスクが上昇しているかどうかを決定する方法を提供することも、本発明の範囲内であり、該方法は、S T Hタンパク質の発現に関して該被験者の診断サンプルをアッセイすることを含み、ここでは、正常よりも上昇したS T H発現の検出が、該被験者がA Dを持っている(もしくはA Dを持っていた、剖検の場合)か、またはA Dを進展させるリスクが上昇していることを指し示すものである。

10

【0075】

本明細書で使用されるように、「正常よりも上昇したS T H発現」は、同性および同様の年齢の非罹患被験者もしくは患者(すなわち、神経変性疾患(例えばA D)を持っていないか、または神経変性疾患(A D)を進展させる検出可能な上昇したリスクを持っていないもの)から採取された同じタイプの診断サンプルに関して予期されるレベルよりも有意により高いレベルでの、S T Hの発現を意味する。本明細書中で更に使用されるように、「有意により高い」は、正常よりも上昇したS T H発現レベルおよびS T Hの予期される(正常な)レベルの間の差違が、統計的に有意であることを意味する。好ましくは、正常よりも上昇したS T H発現は、その他の場合に予期されるレベルのS T H発現よりも少なくとも10%高いレベルでのS T H発現である。S T H発現が特定の被験者もしくは患者から採取された特定の診断サンプルには存在しないと予期される場合は、その被験者もしくは患者に関する正常なレベルのS T H発現はゼロである。特定の被験者もしくは患者から採取された特定の診断サンプルが低レベルの本来のS T H発現を持っていると予期される場合は、その低いレベルは、その被験者もしくは患者に関しての正常レベルのS T H発現である。

20

【0076】

被験者もしくは患者から採取された特定の診断サンプルに関して予期される、もしくは正常レベルのS T H発現は、同様の年齢の、および同性の非罹患被験者をアッセイすることにより容易に決定されるかも知れない。一旦これらの適切なサンプルが得られれば、男性および女性における正常量のS T H発現は、以下に記載されるような、フロー・サイトメトリー、ウェスタン・プロット解析、またはタンパク質の量を測定するためのE L I S Aのような、定量用の標準的なアッセイを使用して決定されてもよい。例えば、E L I S Aは各サンプルに関して2回実行されてもよく、該S T Hタンパク質の量の平均および標準偏差が決定されてもよい。必要な場合は、S T H発現の正常量が定量される前に、追加の被験者が動員されてもよい。

30

【0077】

本発明の方法によれば、該神経変性疾患は、アルツハイマー病(A D)を包含する前記のものいづれであってもよい。好ましい実施形態では、該神経変性疾患はA Dである。1つのこのような好ましい実施形態では、該A Dは後発性A D(L O A D)である。該被験者の該診断サンプルは、前記のように組織または体液であってもよく、前で議論されたものを包含する既知の手順により該被験者から除去されてよい。1つの実施形態では、該診断サンプルは血液サンプルである。加えて、該診断サンプルは、前記の種々のタンパク質アッセイ、タンパク質検出方法、およびタンパク質定量方法の全てを使用して(例えば、E L I S AおよびR I Aによって)、i n v i t r oまたはi n v i v oにおいてアッセイされてもよい。1つの実施形態では、該診断サンプルは前で定義されたように、S T Hと反応性の物質を使用してアッセイされる。該物質は前記のように、検出可能なマーカーで標識されてもよい。好ましい実施形態では、該診断サンプルは、S T Hに選択的

40

50

に結合する抗体を使用してアッセイされる。好ましくは、該抗体は、検出可能なマーカーで標識される。

【0078】

上昇したレベルのS T Hタンパク質は、アルツハイマー病の上昇したリスクと関連していると思われるので、培養中または齧歯類中（遺伝子導入手法による）の細胞中でのこのタンパク質の過剰発現は、S T Hタンパク質の過剰発現がアルツハイマー病に関するリスクを上昇させるメカニズム中へ、価値ある洞察を提供するであろう。S T Hの該S T H - Rアイソフォームを発現するマウスまたは細胞培養物（前記遺伝子導入非ヒト動物および形質転換された宿主細胞を包含する）は、この点において特に価値を有するであろう。ヒト集団における該S T H - R同種接合は、A p o E 4対立遺伝子のような、アルツハイマー病に関する他のリスク要因がない場合にさえ、前記R R遺伝子型がアルツハイマー病を引き起こすに充分であることを論証している。これ故に、S T Hの該S T H - Rアイソフォームを過剰に発現するマウスが、アルツハイマー病様の病状を進展させると予期され得る。このようなマウスは、この疾患に関する治療の開発および試験において、非常に価値を有するであろう。

10

【0079】

被験者における該S T H - R遺伝子型の存在、およびアルツハイマー病を進展させる該被験者のリスク間の相関があるという発見は、A Dもしくはもう1つ別の神経変性疾患を持つ患者、またはA Dもしくはもう1つ別の神経変性疾患を進展させるリスクが上昇している患者を同定する手段を提供し、A Dのような神経変性疾患の進展し易さに関してスクリーニングする試験の形態での、商業適用に関する潜在力を表す。このような試験の開発は、A Dのような神経変性疾患の早期の検出および診断において支援するかも知れない一般的なスクリーニング手順を提供し、および/または神経変性疾患（例えばA D）と診断されたか、もしくは神経変性疾患（例えばA D）を進展させるリスクが上昇しているものとして同定された患者のフォロー・アップの方法を提供し得るであろう。

20

【0080】

従って、本発明は更に、神経変性疾患（例えばA D）を持っているか、または神経変性疾患（例えばA D）を進展させるリスクが上昇している被験者を同定するスクリーニング・アッセイとしての使用のためのキットを提供する。本発明の該キットは、S T Hの1つ以上の対立遺伝子をコード化する核酸配列の存在を直接検出するアッセイにおける使用のための少なくとも1つの試薬、またはS T Hタンパク質の1つ以上のアイソフォームの存在を検出するアッセイにおける使用のための少なくとも1つの試薬を含む。該キットはまた、該被験者がアルツハイマー病（A D）を持っているかもしくはA Dを持っていたか（剖検の場合）、またはA Dを進展させるリスクが上昇しているどうかを決定するための該キットの使用に関する説明書を含む。

30

【0081】

このような説明書は、例えば、該キットがサイトヒン（S T H）の1つ以上の対立遺伝子の存在に関して、被験者の診断サンプルをアッセイするのに使用されてもよいことを提供してもよく、ここで該S T H - R対立遺伝子の存在の検出は、該被験者がA Dを持っている（もしくはA Dを持っていた、剖検の場合）か、またはA Dを進展させるリスクが上昇していることを指し示すものである。加えて、このような説明書はまた、該キットがサイトヒン（S T H）タンパク質の発現に関して被験者の診断サンプルをアッセイするのに使用されてもよいことを提供してもよく、ここで正常を上回って上昇したS T H発現の検出は、該被験者がA Dを持っている（もしくはA Dを持っていた）か、またはA Dを進展させるリスクが上昇していることを指し示すものである。本発明の1つの実施形態では、該キットは更に、該試薬および該説明書が梱包される容器を含む。

40

【0082】

S T Hの1つ以上の対立遺伝子をコード化する核酸配列の存在を検出するように設計されたキットは、S T Hと特に反応性の物質を含有してもよい。該物質は、該S T H遺伝子の該S T H - Q対立遺伝子または該S T H - R対立遺伝子をコード化する核酸配列に選択

50

的に結合するオリゴヌクレオチド・プローブを包含する前記のものいずれであってもよく、S T Hの1つ以上の対立遺伝子の存在を検出もしくは定量するための前記のアッセイもしくは方法のいずれにおいて使用されてもよい。本発明の該キットはまた、該S T H遺伝子の一部もしくは全てに対応する核酸配列の増幅された断片へとハイブリダイゼーション可能な、およびS T Hの1つ以上の対立遺伝子の存在を同定するのに使用され得る対立遺伝子特異的プローブを包含してもよい。更に、S T Hの1つ以上の対立遺伝子をコード化する核酸配列の存在を検出するために設計されたキットは、該S T H遺伝子の一部もしくは全てに対応する核酸配列へとハイブリダイゼーションし、該配列の増幅（例えば、L C R、P C R、および他の当業界において既知の増幅手順による）を可能にするプライマーを含有してもよい。

10

【0083】

該S T Hタンパク質の1つ以上のアイソフォームの存在を検出するために設計されたキットは、S T Hと特に反応性の物質を含有してもよい。該物質は、該S T Hタンパク質の該S T H - Qもしくは該S T H - Rアイソフォームに選択的に結合する対立遺伝子特異的抗体を包含する前記のもの内のいずれであってもよく、S T Hの1つ以上の対立遺伝子の存在を検出もしくは定量する前記のアッセイもしくは方法の内のいずれにおいて使用されてもよい。本発明の該キットはまた、S T Hタンパク質に結合可能な固体の支持体を用いて、好ましくは検出可能なマーカで標識されて、S T Hを指向した少なくとも1つの対立遺伝子特異的抗体を包含してもよい。

【0084】

本発明は、以下の実験の部において記載され、これは、本発明の理解における助けとなるように説明され、この後伴う請求項において定義されるような本発明の範囲を、如何なるやり方であっても限定するように解釈されるべきではない。

20

【実施例】

【0085】

[実験の詳細]

[1 . はじめに]

2月に、ヒトゲノムプロジェクトが、染色体17q21上のタウ遺伝子座を重複するゲノムクローンに関する配列決定を完結させ、発現された配列tag (EST) (寄託# A A 3 2 5 3 0 4) が、図6に示されるタウ遺伝子のエクソン9の下流約2.5kbのタウ・イントロン中で同定された。この位置は本発明者らにとって特に興味あるものであったが、これは、F T Dにおける突然変異の殆どが、このイントロンおよび隣接するタウのエクソンの中もしくは周辺にあるからである(3)。該ESTは、マラトン (Marathon) 小脳cDNAライブラリー (Clontech) 中、およびヒトオリゴ樹状膠腫細胞株 (これはタウを発現する) 中に発現されているのが見出された。しかしながら、C O S 7細胞から単離されたmRNAは、R T - P C R産物を得るのには上手く行かず、これにより、該mRNAがC O S 7細胞中に発現されなかったことが示唆された (データは示されていない)。

30

【0086】

ヒトオリゴ樹状膠腫細胞株からのRNAを使用して、本発明者らは、新しいヒトの遺伝子を発見し、これは、ヒト集団において少なくとも2つの形態で存在する。この遺伝子は、彼らはこれをサイトヒン (S T H) と名付けたが、染色体17上、微小管関連タンパク質タウをコード化する遺伝子のイントロン内にある。このサイトヒン遺伝子によりコード化される該タンパク質は、該微小管関連タンパク質タウには似ておらず、如何なる他の既知のタンパク質にも実質的に似ていない。更に、タンパク質データベースの探索は、サイトヒンに対して有意な相同性を有するもう1つ別のタンパク質を解明していない。

40

【0087】

[2 . 材料および方法]

[A . サイトヒン (S T H) 遺伝子のクローニング]

ヒトオリゴ樹状膠腫細胞株からのRNAを使用して、この推定の遺伝子の5'および3'

50

末端が、Gene Racer kit (Invitrogen) を用いてクローンされた。この全長のクローンの配列は、新しい遺伝子サイトヒン (STH) [故サイトウ・ツナオ博士および彼の研究室に因んで名付けられた] を解明し、これは、イントロンがなく、タウに比べてセンス方向であった。

【0088】

[B . STH 遺伝子発現の解析]

STH を更に特徴付けるために、本発明者らは、Human Tissue Rapid-Scan^a Panel (Origene) を使用して、24 のヒト組織における遺伝子発現を解析した (図8)。STH およびタウは共通の遺伝子座を分け合うので、本発明者らは、STH およびタウが協調して発現され得るであろうと仮定した。これ故に、タウの発現も試験された。代わりにスプライシングされたそのエクソン10の上流のSTHの位置がその発現に影響を及ぼすであろうかどうかを決定するために、エクソン10を有する (図8、パネルA、上方のバンド) およびエクソン10を有さない (図8、パネルA、下方のバンド) タウのアイソフォームも試験された。タウおよびSTHは一般的な組織での発現において有意に重複しているので、更なる研究が、中枢神経系 (CNS) 発現パターンを決定し、STH およびタウが脳中で協調して発現されるかどうかを突き止めるために、Human Brain Rapid-Scan^a Panel (Origene) を使用して実行された。

10

【0089】

これらの研究では、cDNA は「タッチダウン」PCR法 (11) を使用して増幅された。使用されたプライマーは、F Cell I (5' - ccc t g t a a a c t c t g a c c a c a c - 3') および R Cell I (5' - c a t g g g a a g t a g c t t c c c t g t - 3') であった。PCRは、20 mMのTris-HCl (pH 8.4)、50 mMのKCl、1.5 mMのMgCl₂、0.2 μMの各プライマー、0.2 mMのdNTPs、2 μLのゲノムDNA、および1 UのTaqポリメラーゼ (Invitrogen) を含有する50 μLの反応混合物中で実行された。

20

【0090】

サイトヒンに関しての該タッチダウンPCR法は、以下の段階からなる：最初のアニール化サイクルのために、94 °Cにて3分間インキュベーション後、94 °Cにて30秒間の段階、65 °Cにて30秒間の段階 (各々の連続したサイクルにおいて、このアニール化温度は0.2 °C下げられる)、およびポリメリゼーションのために、72 °Cにて30秒間の段階を伴う。この配列はその後、25サイクル繰り返される。最終的に、追加の10サイクルのセットが行われ、これは94 °C 30秒間、60 °C 30秒間、および72 °C 30秒間からなる。最後のサイクルは、72 °Cにて30秒間のインキュベーションを伴う。タウ転写物の増幅に関しては、このPCR混合物およびタッチダウン・プログラムは、このタウ・センス・プライマーが21-mer 5' - g c c a a c g c c a c c a g g a t t c c a g c a a a a - 3' であり、このアンチセンスプライマーが21-mer 5' - t t t a c t t c c a c c t g g c c a c c t - 3' であり、55秒のより長いPCRポリメリゼーション時間が使用される以外、前記と同じであった。サイトヒンおよびタウPCR産物両方が、臭化エチジウムを有する2.0%アガロース・ゲル上で行われた。

30

40

【0091】

[C . STH の DNA の PCR 増幅 および 制限酵素 による 消化]

対立遺伝子分類ゲル (図5) に関して、QQ、QR および RR 遺伝子型のHinFI-消化PCR産物が、既知のプロトコールに従って調製された。特に、該被験者のゲノムDNAが、製造者プロトコール (Qiagen) に従って、ゲノムDNA抽出キットを使用して、凍結脳組織から抽出された。このサイトヒンDNA配列はその後、プライマーF-Cell I および R-Cell I を使用する、サイトヒンに関する前記PCRプロトコールを使用して、AD および正常なコントロールの被験者からのゲノムDNAから増幅された。このPCR産物の配列決定は、ヌクレオチド多型A/Gを同定し、これは7番目の位置の

50

アミノ酸をグルタミン (Q) からアルギニン (R) へと変え、これによって新しい H i n F I 制限酵素部位を創出した。遺伝子型の分類に関しては、該 P C R 産物は、3 時間 3 7 にて、5 単位の H i n F I { 5 ' - G A N T C - 3 ' } 制限酵素 (N e w E n g l a n d B i o l a b s) で消化され、その後臭化エチジウムを有する 2 . 0 % アガロース・ゲル上で行われた。

【 0 0 9 2 】

[D . S T H のモノクローナル抗体]

サイトヒン・モノクローナル抗体 1 1 F 1 1 (I g G 2 B)、T S 6 (I g M)、および 1 0 B 3 (I g M) が、前記のように (1 2) マウスを S T H の組み換えおよび合成両方のペプチドで免疫することにより、生成された。該 Q Q、Q R および R R 遺伝子型を有する正常 (N C) およびアルツハイマー病 (A D) 被験者の脳タンパク質サンプルが、1 X T B S (2 m M の P M S F) 中で均一化され、タンパク質が、大きさによる分画により部分的に精製された。引き続き、これらの調製されたサンプルは、3 7 にて 3 0 分間尿素サンプル緩衝液中でインキュベートされ、その後 1 5 % S D S - P A G E ゲル上で走らされた (図 9)。E C L - ウェスタン・プロット解析が、以前に記載されたプロトコール (1 2) を使用して行われた。

【 0 0 9 3 】

[3 . 結果および議論]

該 S T H 遺伝子のヌクレオチドおよびアミノ酸配列解析 (図 7) は、S T H が、遺伝子、タンパク質、シグナル配列、またはモチーフに対して明確な相同性を持たないように思われる 1 2 8 アミノ酸のタンパク質をコード化する (1 4) ことを解明した。しかしながら、該タウ遺伝子座内の S T H の位置は、その機能へと洞察を提供し得るであろう。S T H およびタウの両方が同様の発現パターンを分かち合うので、タウおよび S T H は、コリン・アセチルトランスフェラーゼ \ 胞状アセチルコリン・トランスポーター遺伝子座の例 (1 5) においてと同様に、一緒に機能し得るであろう。マウスのゲノムは、サイトヒンのオープン・リーディング・フレームに 1 0 0 % 同じ配列を含有し、このことは、この遺伝子が、齧歯類およびヒトの間で保存されていることを強く示唆する。マウスのゲノムは、該 S T H オープン・リーディング・フレームに 1 0 0 % 同じ配列を含有し、このことは、この遺伝子が、齧歯類およびヒトの間で保存されていることを強く示唆する。

【 0 0 9 4 】

S T H を更に特徴付けるために、本発明者らは、Human Tissue Rapid - Scan^a Panel (Origene) を使用して、ヒトの 2 4 の組織中での遺伝子発現を解析した。S T H の発現は、胎盤、筋、胎児脳、および成人の脳において最も高く、心臓、腎臓、胃、精巣、および副腎においては低い発現だった (図 8、パネル A)。S T H およびタウは共通の遺伝子座を分け合うので、それらは協調して発現され得るであろう；これ故に、タウの発現も決定された。代わりにスプライシングされたエクソン 1 0 の上流の S T H の位置がその発現に影響を及ぼすであろうかどうかを決定するために、エクソン 1 0 を有するタウのアイソフォーム、およびエクソン 1 0 を有さないタウのアイソフォームも試験された。図 8 パネル B に示されるように、タウの発現は心臓、腎臓、筋、精巣、唾液腺、副腎、成人および胎児の脳において最も高く、胎盤、甲状腺、前立腺、および皮膚において低い発現であることが見出された。このことは、タウ発現についての他の報告 (1 6) と一致している。

【 0 0 9 5 】

タウおよび S T H が、一般的な組織での発現において有意に重複しているので、更なる研究が、Human Brain Rapid - Scan^a Panel (Origene) を使用して行われ、中枢神経系 (C N S) での発現パターンを決定し、S T H およびタウが脳中で協調して発現されるかどうかを突き止めた。図 8 パネル C は、S T H が C N S において発現され、側頭葉、視床下部、髄および脊髄においてより高発現であり、その他の脳領域ではより低発現であることを示す。図 8 パネル D において描かれるように、タウの発現は、該発現がより低い場合、橋中を除いて、C N S サンプルの殆どにおいて高い。

【 0 0 9 6 】

本発明者らによって解析された一般組織およびCNS組織での発現に基づけば、タウは、S T Hと幾つかの組織での発現を分かち合うように思われるが、幾つかの相違がある。一緒に解釈されれば、これらの結果はS T Hがタウのプロモーターの制御下にないことを指し示すが、タウ遺伝子と幾つかの領域制御要素を分かち合い得るであろうし、該タウ遺伝子は、S T Hの機能に関して暗示するであろう。該エクソン10の上流のS T Hの位置および発現は、CNSまたはその他の組織においてはタウのエクソン10のスプライシングと相関するようには思われない。

【 0 0 9 7 】

S T Hの位置は、神経変性疾患におけるその可能な役割中へと研究を確かなものとし、これは、これらの疾患の内の多くにおいて該タウ遺伝子座を暗示する遺伝子的な証拠があるからである。ヒトの被験者からの該S T H遺伝子の配列決定の間に、図7に示されるように、S T Hのアミノ酸の位置7 (Q 7 R)において、グルタミン (Q) からアルギニン (R) へと変わるヌクレオチド多型 (A G) が同定された。この「 G 」多型 (R 対立遺伝子) は、この「 A 」ヌクレオチド (Q 対立遺伝子) に比較して区別可能な断片パターンを生成する新規H i n f I制限酵素部位を創出する。代表的なゲルが図5に示される。

10

【 0 0 9 8 】

異なるS T H対立遺伝子および頻度を有するA Dおよび正常コントロール被験者の分布は、表1に表として纏められた。被験者らのこれらの2つの群は、年齢的に適合され、コーカソイド人種の被験者に限定された。該R R遺伝子型は、該正常コントロール被験者 (0 %) に比較して、該A D群において有意により高い頻度 (1 6 %) にて見出された ($p = 0 . 0 2 3 2$; オッズ比 1 1 . 9 2 0 、フィッシャーの精密試験による) 。該R対立遺伝子は、正常な被験者においては1 3 %の頻度にて起こるが、該R対立遺伝子が3 2 %であるA D被験者に比較して、有意により低いパーセンテージにて起こる ($p = 0 . 0 0 8 5$; オッズ比 3 . 1 0 9 、フィッシャーの精密試験による) 。該R R被験者に関する発症の平均年齢は、7 7 ~ 9 3 歳の範囲で8 3 . 1 歳であり、このことは、R R遺伝子型が後発性アルツハイマー病に関するリスク要因であるとの証拠を提供する。

20

【 0 0 9 9 】

【表 1】

表 1 : AD および正常被験者における STH 多型

サイトヒン遺伝子型	AD n = 1	正常 n = 30
QQ	26 (51%)	22 (73%)
QR	17 (33%)	8 (27%)
RR	8 (16%)	0 (0%)
サイトヒン対立遺伝子	n = 102	n = 60
Q	69 (65.6%)	52 (86.7%)
R	33 (32.4%)	8 (13.3%)

合計 81 の被験者が、ケースコントロール研究に関して使用された。被験者のこの AD 群 (n = 51) および正常コントロール群 (n = 30) は、剖検で確かめられ、年齢的に適合された。フィッシャーの精密試験が、包含されるこれらの群について、対立遺伝子および遺伝子型の頻度の比較に関して使用された。正常 (平均年齢 = 78.83 ; 範囲 55 ~ 97 歳) ; アルツハイマー病 (AD) (平均年齢 = 80.51 ; 範囲 56 ~ 98 歳)。

【 0 1 0 0 】

該 STH 遺伝子型に加えて、これらの被験者の該 ApoE 遺伝子型も決定され、これは該 ApoE 遺伝子の対立遺伝子 4 が AD に関する重要なリスク要因だからであり、本発明者らが、該 ApoE 対立遺伝子 4 が該 STH 遺伝子型と共同して働き得るであろうか (17) どうか調べたかったからである。該 ApoE 遺伝子型は、一般的な集団における頻度と密接に一致していて、このことにより、サンプリングにおけるバイアスに対する証拠を提供した (データは示されていない) (18)。以前の報告と一致して、該 ApoE 4 対立遺伝子は、表 2 に示される正常なコントロール被験者に比較して、本発明者らの AD 群において過剰に発現されていることが見出された ; しかしながら、該 ApoE 対立遺伝子は、表 3 中の AD 群の RR、QR、および QQ 被験者の間では等しく分布しており、このことは、該 ApoE および STH 遺伝子型の間、何も関連がないことを示唆した (18)。

【 0 1 0 1 】

10

20

30

【表 2】

表 2 : AD および正常コントロールにおける ApoE 遺伝子学

ApoE 遺伝子型	AD n = 1	正常 n = 30
2 / 2	0 (0%)	0 (0%)
2 / 3	3 (5.9%)	7 (23.3%)
2 / 4	0 (0%)	0 (0%)
3 / 3	22 (43.1%)	19 (63.4%)
3 / 4	20 (39.2%)	4 (13.3%)
4 / 4	6 (11.8%)	0 (0%)
ApoE 対立遺伝子	n = 102	n = 60
2	3 (2.9%)	7 (11.7%)
3	67 (65.7%)	49 (81.7%)
4	32 (31.4%)	4 (6.6%)

10

20

ApoE の遺伝子型分類が、以前に記載されたように (20) 行われた。フィッシャーの精密試験が、包含されるこれらの群に関して、ApoE4 保持者 ($p = 0.0008$; $OR = 6.760$; $CI = 2.062 \sim 22.166$) および ApoE4 対立遺伝子頻度 ($p = 0.0002$; $OR = 6.4$; $CI = 2.136 \sim 19.178$) の比較のために使用された。

【0102】

【表 3】

表 3 : ApoE 遺伝子型と比較した STH 遺伝子型

AD n = 51 STH 遺伝子型	ApoE4 陰性 n = 25	ApoE4 陽性 n = 26
QQ	13	13
QR	8	9
RR	4	4
正常 n = 30 STH 遺伝子型	ApoE4 陰性 n = 26	ApoE4 陽性 n = 4
QQ	20	3
QR	6	1
RR	0	0

10

論理回帰解析が、AD および正常集団における ApoE4 の RR 遺伝子型との関連の決定のために、統計プログラム SPSS を用いて行われた。

20

【0103】

該 AD 群に加えて、他の神経変性疾患（これらの内の殆どがタウ病理を持つ）を有するより少数の被験者も、該多型について試験された。これらの結果は表 4 に説明されるが、幾つかの興味ある傾向を示し、この STH - Q / R 多型が AD に特異的ではないかも知れないことを示唆する。例えば、区別可能な組織病理を欠く痴呆を有する 1 被験者は、該 RR 遺伝子型を持ち、このことによりこの遺伝子型が AD に特異的ではないことを示唆した。更に、正常コントロールと比較した場合、PSP 被験者は該 QQ 遺伝子型を過剰に表す一方、FTD およびピック病はより高いパーセンテージの QR 遺伝子型を持つと思われる。より大きな群の被験者を用いたこれらの傾向の更なる調査が、それらの重要性を決定するために要求される。

30

【0104】

【表 4】

表 4：非 AD 神経変性疾患におけるサイトヒン多型

サイトヒン 遺伝子型	DLDH n = 7	PSP n = 6	FTD n = 4	CBD n = 4	PICKS n = 9	ALS n = 1
QQ	4 (57 %)	5 (83 %)	1 (25 %)	1 (100 %)	3 (33 %)	1 (100 %)
QR	2 (29 %)	1 (17 %)	3 (75 %)	0	6 (67 %)	0 (0 %)
RR	1 (14 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

10

被験者の数は、統計解析にとっては少な過ぎた。区別可能な組織病理を欠く痴呆 (DLDH)、前頭側頭葉痴呆 (FTD)、ピック病 (PICKS)、進行性核上麻痺 (PSP)、皮質基底変性 (CBD)、および筋萎縮側硬化 (ALS) を有する被験者が研究された。

【0105】

STH発現を論証する実験はこれ故に更にPCRの使用に依るが、PCRは非常に敏感なので、バンドが正統なmRNA転写物に由来するか、または痕跡量のDNAの混入から来るものなのかを確かめるのは難しい。イントロンのない遺伝子と共に作動する場合は、該mRNAの配列が該遺伝子をコード化するゲノムDNAと精密に合致し、DNA混入は問題となったままである。COS7細胞中およびMultiple Tissue cDNAパネルの幾つかの組織中にSTH mRNAの証拠を見付けることの一貫した失敗は、混入に対して論議するものである。

20

【0106】

本発明者らは、STHタンパク質産物の存在を論証するために、6-Hisを取り付けられた組み換えタンパク質として、またはバクテリア中のグルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質として産生された、予見されたタンパク質に対するモノクローナル抗体を生成させた。該STH配列からの合成ペプチドおよび欠損突然変異タンパク質の組み合わせを使用して、これらのモノクローナル抗体によって認識されたエピトープが、STHの3つの異なる領域：N-末端、中央領域、およびC-末端へとマッピングされた。図9(上の3つのパネル)において、GST(DT12)、6XHis、およびSTH(TS6)に対する抗体を用いた3つの代表的な免疫プロットが、これらのモノクローナル抗体の特異性を論証する。

30

【0107】

図9(下の3つのパネル)に描かれるように、STHタンパク質は、AD被験者および正常被験者からの脳ホモジェネートの免疫プロットによって検出され、STHタンパク質の該N-末端(11F11、IgG2B)、該C-末端(10B3、IgM)、および介在配列(TS6、IgM)に対する抗体を使用した。これらの免疫プロットは、13.6kDの計算された大きさよりも約20kD~6kD多い明確な分子量を有するタンパク質を示す。同様のタンパク質が、STHの3つの異なるエピトープと反応性の3つの全ての抗体により認識される。加えて、STHに対する他のN-末端抗体が、同様のプロット結果(データは示されていない)を示す。この大きさの違いは、アミノ酸組成、翻訳後修飾、および/またはそれ自身もしくは他のタンパク質との凝集によるものであり得るであろう。この凝集仮説は、これらのプロットの全てに共通のより大きな分子量のバンドの存在を説明するであろう。更なる調査が、どの仮説(単数または複数)が正しいかを決定するであろう。

40

【0108】

50

[4 . 結論]

本明細書中で開示される実験および結果に基づけば、幾つかのことが S T H について分かる。S T H は、該タウ遺伝子座中に巣くった (nested) 遺伝子である。それはタウの発現パターンに非常に似た発現パターンを持ち、これらの 2 つのタンパク質が共同して発現され、経路中一緒に機能するかも知れないことを示唆する。このような状況のよく研究された例は、コリン・アセチルトランスフェラーゼ (C H A T) / 胞状アセチルコリン・トランスポーター (V C H A T) 遺伝子座である。該 V C H A T 遺伝子は、該 C H A T 遺伝子のエクソン 1 および 2 の間のイントロン内にある。該 V C H A T および C H A T 遺伝子は、協調して発現され、それぞれ神経伝達物質アセチルコリン (A C H) の小胞中への取り込み、および A C H 合成中に含まれる (1 5)。魅力的な仮説が、S T H およびタウが、正常状態で一緒に機能するだけでなく、疾患状態でも一緒に機能するかも知れないことを浮かび上がらせ始めている。

10

【 0 1 0 9 】

該 S T H 遺伝子における Q 7 R 多型がヒト被験者において同定され、L O A D 集団において同種接合状態で過剰に表れることが見出された。該 R R 遺伝子型は、A D 患者におけるその同種接合状態のために、「機能の欠損」突然変異を示唆している。S T H が正常な細胞機能を持つことが推定される。配列解析は手がかりを得ていないが、S T H の機能および A D における可能性ある役割に対するヒントがあるかも知れない。S T H は共通認識標的化シグナル配列を欠いているので、それは推定の細胞質タンパク質である；これ故に、それはタウと同じコンパートメント中に置かれているかも知れない。S T H は、タウとは異なり、プロリンを指向したリン酸化部位を持たない。しかしながら、正常には中枢神経系において重要な役割を持ちタウのリン酸化および A D において暗示される (1 9) P K C および C K I I キナーゼについては、S T H 上に推定のリン酸化部位がある。種々のタウもしくはアミロイド病理を有する神経変性疾患における S T H の今後の遺伝子研究は、S T H が神経繊維の絡み合いおよび / またはアミロイド斑の形成において役割を演じるかどうかを決定するのを助け得るであろう。

20

【 0 1 1 0 】

[引用文献]

1 . Beers and Berkow, eds., The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17th ed . (Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories, 1999) 1395-1398, 1442-48

30

【 0 1 1 1 】

2 . Myers and Goate, Curr. Opin. Neurol., 14:433, 2001.

【 0 1 1 2 】

3 . Buee et al., Brain Res. Rev., 33:95, 2000.

【 0 1 1 3 】

4 . Lewis et al., Science, 293:1487, 2001.

【 0 1 1 4 】

5 . Roks et al., Neurosci. Lett., 277:137, 1999.

【 0 1 1 5 】

6 . Crawford et al., Neurosci. Lett., 266:193, 1999.

40

【 0 1 1 6 】

7 . Lilius et al., Neurosci. Lett., 277:29, 1999.

【 0 1 1 7 】

8 . Baker et al., Neurosci. Lett., 285:147, 2000.

【 0 1 1 8 】

9 . Kwon et al., Neurosci. Lett., 284:77, 2000.

【 0 1 1 9 】

1 0 . Baker et al., Hum. Mol. Genet., 8:711, 1999.

【 0 1 2 0 】

50

1 1 . Hecker and Roux, *Biotechniques*, 20:478, 1996。

【 0 1 2 1 】

1 2 . Jicha et al., *J. Neurosci.*, 19:7486, 1999。

【 0 1 2 2 】

1 3 . Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: John Wiley and Sons, New York, 1997)。

【 0 1 2 3 】

1 4 . Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389, 1997。

【 0 1 2 4 】

1 5 . Y. Oda, *Pathol. Int.*, 49:921, 1999。

10

【 0 1 2 5 】

1 6 . Gu et al., *J. Neurochem.*, 67:1235, 1996。

【 0 1 2 6 】

1 7 . Saunders et al., *Neurology*, 43:1467, 1993。

【 0 1 2 7 】

1 8 . Corder et al., *Cell Mol. Life Sci.*, 54:928, 1998。

【 0 1 2 8 】

1 9 . Jin and Saitoh, *Drugs Aging*, 6:136, 1995。

【 0 1 2 9 】

2 0 . Wenham et al., *Lancet*, 337:1158, 1991。

20

【 0 1 3 0 】

2 1 . R. Weiss, *Science*, 254:1292, 1991。

【 0 1 3 1 】

本明細書中前記の全ての刊行物は、それらの全体を援用される。以上の本発明は明確化および理解の目的で幾分詳細に記載されたが、一方当業者によって、この開示の読解から、形態および詳細における種々の変更が添付の請求項における本発明の真の範囲から逸脱することなくなされ得ることが、認められるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 3 2 】

【 図 1 】 図 1 は、サイトヒン - Q (S T H - Q) 遺伝子 (配列 I D 番号 : 1) のヌクレオチド配列を描いている。このタンパク質の開始 (a t g) および停止 (t a g) コドンが、下線を施されている。S T H - Q のヌクレオチド配列は、S T H - Q 中では A (大文字化され、太字化されている) である 1 2 6 番目のヌクレオチドにおいて、サイトヒン - R のそれと異なる。

30

【 図 2 】 図 2 は、サイトヒン - R (S T H - R) 遺伝子 (配列 I D 番号 : 2) のヌクレオチド配列を描いている。このタンパク質の開始 (a t g) および停止 (t a g) コドンが、下線を施されている。S T H - R 中では、1 2 6 番目のヌクレオチドが G (大文字化され、太字化されている) である。

【 図 3 】 図 3 は、S T H - Q タンパク質の予見されるアミノ酸配列を説明する (配列 I D 番号 : 3) 。該 S T H - Q 遺伝子の 1 2 6 番目のヌクレオチドは結果的に、該 S T H - Q タンパク質の 7 番目の位置にて Q (グルタミン) となっている。

40

【 図 4 】 図 4 は、S T H - R タンパク質の予見されるアミノ酸配列を示す (配列 I D 番号 : 4) 。該 S T H - Q および S T H - R 遺伝子の 1 2 6 番目のヌクレオチドにおける違いは、該 S T H - Q タンパク質中の Q (グルタミン) を、該 S T H - R タンパク質中の R (アルギニン) へと変えるものである。

【 図 5 】 図 5 は、以下に記載される方法による、Q Q、Q R、および R R 遺伝子型の H i n F I - 消化 P C R 産物の代表的な対立遺伝子分類ゲルを説明する。この多型は、新規 H i n F 1 制限酵素部位を創出する。H i n F 1 - 消化 P C R 産物は、Q 対立遺伝子を有する被験者において 2 つのバンド (1 7 1 塩基対および 5 5 塩基対にて) を与え、R 対立遺伝子を有する個体において 3 つのバンド (5 5 塩基対、7 4 塩基対、および 9 7 塩基対に

50

て)を与える。2つのQQ同種接合体、2つのQR異種接合体、および2つのRR同種接合体が示される。

【図6】図6は、タウ遺伝子のエクソン9の下流のイントロン内の、タウ遺伝子座およびサイトヒン遺伝子の物理的な位置(鉛直のバー、上)を例示する。

【図7】図7は、STHタンパク質に関するオープン・リーディング・フレームを描く。このヌクレオチド配列に関して予見されるアミノ酸(3文字略号)が示される。7番目のアミノ酸における4角で囲まれたグルタミン(gln)コドン[CAA]において、このヌクレオチドの多型(A→G)が、このコドン[CGA]を、該STHタンパク質中でアルギニンへと変える。

【図8】図8は、複数の組織および中枢神経系における、サイトヒンおよびタウのヒトでの発現を示す。RT-PCRが、刊行されたプロトコール(11)に従って、Human Tissue Rapid-Scan(商標)Panel(Origene)(パネルAおよびB)およびHuman Brain Rapid-Scan(商標)Panel(Origene)(パネルCおよびD)上で行われた。サイトヒン発現は、単一バンドとして、これらのパネル中に示される(パネルAおよびC)。パネルBおよびDにおいては、タウのこれらのアイソフォームの発現は、2つのバンドにより表される。上のバンドはエクソン10を有するアイソフォームからなり、下のバンドはエクソン10を有さないアイソフォームを含有する。パネルAおよびB中の複数の組織のレーンは、以下の通りである: 1-脳; 2-心臓; 3-腎臓; 4-脾臓; 5-肝臓; 6-結腸; 7-肺; 8-小腸; 9-筋; 10-胃; 11-精巣; 12-胎盤; 13-唾液腺; 14-甲状腺; 15-副腎; 16-膵臓; 17-卵巣; 18-子宮; 19-前立腺; 20-皮膚; 21-PBL; 22-骨髄; 23-胎児脳; 24-胎児肝。(パネルCおよびD)についてのレーンは、以下の通りである: 1-前頭葉; 2-側頭葉; 3-小脳; 4-海馬; 5-黒質; 6-尾状核; 7-扁桃; 8-視床; 9-視床下部; 10-橋; 11-随; および12-脊髄。

10

20

【図9】図9は、正常な被験者(NC)、ならびにQQ、QRおよびRR遺伝子型を有するアルツハイマー病(AD)被験者の、ウェスタン・ブロット解析を説明する。上の3つのパネルは、組み換え6XHisを取り付けられたサイトヒン(6H-SA)、または6XHisを取り付けられたタウ(6H-TAU)、またはグルタチオンS-トランスフェラーゼ(転移酵素)(GST)、またはGST-サイトヒン融合タンパク質(GST-SA)、GSTに対する抗体を有するもの(DT12)、6XHIS(6HIS)、およびサイトヒン(TS6)を発現する、IPTG誘導バクテリアの全溶解物の免疫ブロットを示す。下の3つのパネルは、刊行されたプロトコール(12)に従った、STHモノクローナル抗体の左、中央、および右のパネル(それぞれ11F11、TS6、および10B3)を有する、AD被験者(QQ-AD、AD-QRおよびAD-RR)および正常被験者(QQ-NC、QR-NC)の、QQ、QRまたはRR遺伝子型からの部分的に精製された脳のホモジェネートの免疫ブロットである。

30

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/36315
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A01N 63/00; A61K 48/00; C12N 15/00, 15/09, 15/63, 15/70, 15/74, 15/85, 15/87; CO7H 21/02, 21/04 US CL : 424/93.2; 435/320.1, 455; 536/23.1		
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) U.S. : 424/93.2; 435/320.1,455;536/23.1		
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) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KERLAVAGE, AR. The cerebellum II Homo sapiens cDNA 5' end, mRNA sequence EST28266. NCBI [online], Bethesda, MD, USA[retrieved on 1 May 2003]. Retrieved from NCBI, GenBank Accession No. AA325304.	6,10,29,30,32,33
X,P	CONRAD et al. A polymorphic gene nested within an intron of the tau gene: Implications for Alzheimer's disease. PNAS. May 2002, Vol. 99, No. 11, pages 7751-7756.	1,2,3,5,6,7,10,11,12,13,15,16,18,19,27,28,29,30,31,32,33,34,35,37,38,39
X,P	POORKAJ et al. A genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau. Mammalian Genome. 2001, Vol. 12, pages 700-712.	1,2,3,6,7,10,11,12,15,18,19
T	STREFFER et al. Saitohin gene is not associated with Alzheimer's disease. J. Neurol Neurosurg. Psychiatry. 2003, Vol. 74, pages 362-363.	45-59
X,P	VERPILLAT et al. Is the Saitohin gene involved in neurodegenerative diseases? Ann. Neurol. 2002, Vol. 52, pages 829-832.	1,2,3,11,12
---		-----
A		45-59
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 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 01 May 2003 (01.05.2003)	Date of mailing of the international search report 29 MAY 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer <i>Telicia D. Rebut</i> for Brian Whiteman Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/36315

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.: 9
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:
Claim 9 is a duplicate of claim 5.
3. Claim 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:
Please See Continuation 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.: 1-8,10-19,27-39,45-59

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/36315

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions, which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional searchfees must be paid.

Group I, claim(s) 1-8, 10-19, 27-39, and 45-59, drawn to an isolated nucleic acid sequence encoding saitoihin (STH), STH protein, method of making the STH protein.

Group II, claim(s) 20-26, drawn to an antibody specific for STH protein.

Group III, claim(s) 40-44, drawn to a transgenic non-human animal whose genome comprises a disruption in the endogenous STH gene.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of Group I is considered to be the STH protein.

The special technical feature of Group II is considered to an antibody for STH protein.

The special technical feature of Group III is considered to a transgenic non-human animal whose genome comprises a disruption in the endogenous STH gene.

Accordingly, Groups I-III are not so linked by the same corresponding or a corresponding technical feature as to form a single general inventive concept.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST 2.1, STN

search terms: tau, Alzheimer's Disease, saitoihin, STH, microtubule associated protein

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00	C
	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100111648

弁理士 梶並 順

(74) 代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(72) 発明者 コンラッド、クリス

アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ブロンクス、イーシャスター・ロード 1945、アパートメント 24エイチ

(72) 発明者 デーヴィス、ピーター

アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ライ、クレアモント・アヴェニュー 40

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA44 BA80 CA01 CA04 CA09 CA11 DA02 GA11 HA12

HA15

4B063 QA01 QA08 QA12 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR56 QR62 QS25

QS34 QX01

4B064 AG26 CA10 CA20 CC24 DA13

4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA46

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA45 DA76 DA86 EA50 FA72

FA74

专利名称(译)	新型细胞因子基因及其用途		
公开(公告)号	JP2005508653A	公开(公告)日	2005-04-07
申请号	JP2003544186	申请日	2002-11-12
申请(专利权)人(译)	Ieshiba大学		
[标]发明人	コンラッドクリス デーヴィスピーター		
发明人	コンラッド、クリス デーヴィス、ピーター		
IPC分类号	A01K67/027 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/4711 A01K2217/05		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.C C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	英年古河 Kajinami秩序		
优先权	60/350316 2001-11-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了编码细胞因子 (STH) 的分离的核酸序列, 一种与所述序列杂交的分离的核酸序列, 由所述核酸序列编码的纯化蛋白质。本发明还提供了纯化的STH蛋白和制备STH蛋白的方法。本发明还涉及STH特异性抗体和该抗体的制备方法。此外, 本发明公开了一种载体, 其包含编码STH的核酸序列, 用所述载体转化的宿主细胞和转基因非人动物。本发明进一步提供了用于确定受试者是否患有神经变性疾病或者是否发生其发展风险的方法, 以及评估受试者预后的方法。

		(P2005-501 (43) 公表日 平成17年4月7日(2005	
(61) Int. Cl. ⁷	FI		テーマコード (参考)
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	4B024
A01K 67/027	A01K 67/027		4B063
C07K 14/47	C07K 14/47		4B064
C07K 16/18	C07K 16/18		4B065
C12N 1/15	C12N 1/15		4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 38 頁) 最終頁
(21) 出願番号	特願2003-544186 (P2003-544186)	(71) 出願人	591054174
(22) 出願日	平成14年11月12日(2002.11.12)		イェシバ・ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月13日(2004.5.13)		YESHIVA UNIVERSITY
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/036315		アメリカ合衆国、ニューヨーク州、フ
(87) 国際公開番号	W02003/042366		クス、モリス・パーク・アペニュー
(87) 国際公開日	平成15年5月22日(2003.5.22)		OO
(31) 優先権主張番号	60/350,316	(74) 代理人	100057874
(32) 優先日	平成13年11月13日(2001.11.13)		弁理士 曾我 道照
(33) 優先権主張国	米国 (US)		100110423
			弁理士 曾我 道治
			100084010
			弁理士 古川 秀利
			100094685
			弁理士 鈴木 重七