

(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 - 521713

(P2003 - 521713A)

(43)公表日 平成15年7月15日(2003.7.15)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/68		G 0 1 N 33/68	2 G 0 4 5
33/53		33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 37数)

(21)出願番号 特願2001 - 556331(P2001 - 556331)

(86) (22)出願日 平成13年2月1日(2001.2.1)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月2日(2002.8.2)

(86)国際出願番号 PCT/EP01/01053

(87)国際公開番号 W001/057535

(87)国際公開日 平成13年8月9日(2001.8.9)

(31)優先権主張番号 00102057.7

(32)優先日 平成12年2月2日(2000.2.2)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 ナッド アーゲー
ドイツ連邦共和国 80339 ミュンヘン、ラ
ントスベルガー シュトラーセ 50

(72)発明者 ローダー , ハンノ
ドイツ連邦共和国 80997 ミュンヘン、メ
ンツィンガーシュトラーセ 160

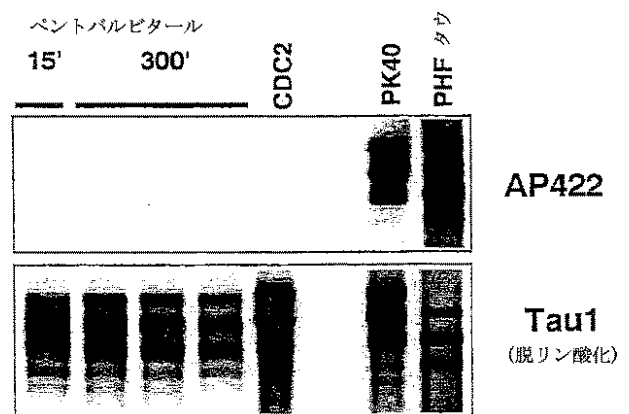
(74)代理人 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経原線維変性の動物モデルを評価するための分析方法

(57)【要約】

本発明は、アルツハイマー病 (A D) の状況をモデル化する方法に関する。特に本発明は、神経原線維変性およびタウの凝集の過程の重要なステップとしてのタウの異常な過剰リン酸化をモデル化する方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルツハイマー病の状況をモデル化する方法であって、

- a) タンパク質ホスファターゼ2A (PP2A) をin vivoで阻害すること、
 - b) 脳または脳の特定領域を外科的に摘出すること、
 - c) 分離した組織をホモジナイズし、超遠心分離または限外濾過し、上清を熱処理すること、
 - d) 可溶性過剰リン酸化タウの存在を評価すること、
- を含む、前記方法。

【請求項2】 ステップd)が、他のホスホアミノ酸が存在しないリン酸化された配列Asp-(P)Ser-Proを含むペプチド抗原に対して作製したポリクローナルまたはモノクローナル1次抗体で行なわれる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ステップd)が、抗ホスホSer422抗体で行なわれる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 ステップd)が、エピトープのマスキングを防ぐための可溶性タウの組織スライス上へのおだやかな固定、次いで、抗ホスホSer422抗体による免疫化学分析により行なわれる、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 ステップa)が、動物の脳内への薬剤または毒素の直接注射または長期間の注入によって行なわれる、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 ステップa)が、動物の脳内へのオカダ酸の直接注射または長期間の注入によって行なわれる、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 ステップa)が、ADの病因に関係することが疑わしい導入遺伝子の発現によって行なわれる、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 ステップc)が、2 μ Mのオカダ酸および2 mMのEDTAおよび500 mMのNaClまたは同等のイオン強度の他の塩を含む中性pHの氷冷緩衝液中で、分離した組織をホモジナイズすることを含む、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 ステップc)が、さらに $>100000 \times g$ で約15～30分間の遠心分離または分画分子量100 kDの限外濾過、および、上清を約5～10分

間煮沸することを含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 神経原線維変性およびタウの凝集の過程の重要なステップとしてのタウの異常な過剰リン酸化をモデル化するための、請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明はアルツハイマー病（AD）の状況(aspect)をモデル化する方法に関し、本発明は特に、神経原線維変性およびタウの凝集の過程の重要なステップであるタウの異常な過剰リン酸化をモデル化するための方法に関する。

【0002】

アルツハイマー病（AD）のための薬剤の開発における主要な障壁の1つは、本症候群の全ての病理学的状況についての動物モデルがないということである。トランスジェニックマウスにおけるアミロイド症の誘発のような、本疾患のいくつかの状況のモデル化が、最近実証された。しかしながら、これらのモデルでは、アミロイド症が、ADに見られるような臨床的に関連する神経変性過程に必ずしも関係していないことが見出され、薬剤開発目的のためのこれらのモデルの価値を大きく制限することになった。

【0003】

神経原線維変性の過程、可能であればより臨床的に関係するものについては、この過程の選択された状況さえモデル化されていない。これは、一部は、組織標本において神経原線維変化の主要な構成物である微小管関連タンパク質タウの生化学的な状態を評価することが、それがしばしばアーティファクトによって隠されるために困難であることによるだろう。

【0004】

細胞病理ならびに臨床症状は過剰リン酸化タウの凝集体に関係しており、この生化学的過程が疾患への重要な一里塚であることを示唆している[Braak and Braak, Acta Neuropathol. 82, 239-259 (1991); Braak et al., Acta Neuropathol. 87, 554-567 (1994); Goedert et al., Neurobiol. Aging 16, 325-334 (1995)]。残念ながら、多くの試みにもかかわらず、明白な過剰リン酸化(hyperphosphorylation)に関連するタウの凝集のモデル化は、今のところ難しいことが明らかになった。さらに、in vivoでタウの過剰リン酸化の正常な状態を確実に評価することは極めて難しい。当然のことながら、この不確かさは、「異常な

」タウの過剰リン酸化の定義を直接制限する。したがって、正常なリン酸化との関係における真のタウの過剰リン酸化を *in vivo* で誘発し、評価することが、その予防に関する薬剤の有効性の評価を可能にする必須条件として、望ましいだろう。

【0005】

発明の背景

過去において、リン酸化部位の特定のサブセットまたは個別の部位のリン酸化の後に、タウタンパク質に対する反応性が増加するかまたは減少する数多くの抗体（リン酸化依存性抗体）が開発された[WO 93/11231]。当初は、これらの抗体の大多数がもっぱらADのような疾患における病理学的に変化したタウに対する反応性を示すと信じられており、この形態のタンパク質が死にかけているニューロンにおける凝集体に関連していたので、「タウの過剰リン酸化」という語が用いられた。しかしながら、この考えがアーティファクトに基づいていることが程なく認識された。実際、動物の死（またはヒト組織の外科的な摘出）とタウの抽出との間の時間が数分に短縮された場合、多くの抗体が *ex vivo* で正常のタウと強く反応した[Matsuo et al., Neuron 13, 989-1002 (1994)]。従って、アーティファクトは、死後（または摘出後）の組織におけるタウの急速な脱リン酸化によって説明された。

【0006】

それにもかかわらず、いくつかの選択された抗体は、正常組織から迅速に抽出したタウ（死後または摘出後数分）に比べ、ADの脳からの病的なタウに実質的に高い反応性を示し、広く使用されている参照のmAb AT8 [Matsuo et al., Neuron 13, 989-1002 (1994)]では、それが最も顕著であった。AT8の正常タウに対する反応性はADのタウに比べて顕著に低いが、動物モデルでのタウの過剰リン酸化の分析には厄介な障壁が依然存在しており、AT8の反応性に対する正常の生理学的過程の影響と、病的な影響を識別するという課題が立ちはだかっている。しかも、いわゆる「正常な」AT8の反応性が数分の時間枠で生じる死後のアーティファクトにより依然汚染されているかもしれないので、ADにおけるタウの過剰リン酸化をモデル化するためのいずれの操作も、AT8で評価

される死後の脱リン酸化の動態を短に軽減するだけであるという解釈を除外できない。最も極端な解釈では、ADの脳からの一見過剰にリン酸化されたタウは、単に正常脳において死後の急速な脱リン酸化に供されていない、正常にリン酸化されたタウを表しているかも知れないとされている。

【0007】

その限界にもかかわらず、新鮮に調製した脳スライス(例4)を含む細胞培養モデルにおける、タンパク質ホスファターゼ阻害剤のオカダ酸で誘発したタウの過剰リン酸化の検出に関しては、AT8は十分に識別力のある抗体である。識別力の弱い抗体であるPHF-1およびTau-1でさえ、培養系ではなお首尾よく使用することができる。これは、細胞系においてAT8のタウへの反応性が通常欠如しているか、または、オカダ酸による誘発が、AT8の通常レベルの反応性に対し明らかな違いをもたらす程度に十分に広範なタウ集団に作用するという事実による。しかも、細胞系では死後のアーティファクトはない。AT8のような抗体がin vivoでのタウの過剰リン酸化の分析に良好に使用し得ることは、当然に予想することができる。

【0008】

現在のところ、in vivoでのタウのリン酸化は、ほとんど常に、抽出されたタウの分析とは対照的な組織における染色によって評価されている。これは、分析上の限界により、過剰リン酸化されたタウが溶液の形でADの脳に存在していることが不確実なためである。過剰リン酸化状態は、不溶性PHF(ペア化1-ヘリカルフィラメント(Paired 1-Helical Filament))凝集体に関して最もよく実証されており[Lee et al., Science 251, 675-678 (1991); Hanger et al., Biochem. J. 275, 99-104 (1991)], それは、その結果正常にリン酸化されたタウタンパク質が存在せず、そして不溶性タンパク質は可溶状態よりも脱リン酸化のアーティファクトからより効果的に保護されるからである。したがって、動物モデル化実験では、組織染色法によりADで見出されたようなニューロンにおける凝集体の形成に焦点が当てられた。

【0009】

ラットの脳内への1回のオカダ酸の注射が、その直後に神経原線維変化を思わ

せる免疫組織化学的变化をもたらすことが報告されている[Arendt et al., Neuroreport 5, 1397-1400 (1994)]。しかしながら、AT8のような真のリン酸化依存性抗体の反応性は証明されていない。使用した抗体(例えばAlz-50)はウェスタンブロットでリン酸化されていないタウタンパク質とさえ反応しており(Roder et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 193, 639-647 (1993))、つまり、観察された効果は、リン酸化というよりはエピトープの露出に関係している可能性がある。イムノブロットでの染色と組織での染色との不一致は、事実上全ての公知のタウ抗体に共通しており、組織の組織学的な処理で用いるような固定の後にタウのエピトープが全体的にマスキングされることにより説明される(例えばTashiro et al., Neuroreport 8, 2797-2801 (1997); Pollock and Wood, J. Histochem. Cytochem. 36, 1117-1121 (1988))。したがって、観察された「アルツハイマー様の」変化は、病的なタウの過剰リン酸化であるとはっきり解釈することはできないが、通常存在しているエピトープが実験操作でマスキングされなかったことによる可能性もある。

【0010】

ラットの脳室内へ、オカダ酸を毒性限界値で数週間にわたり長期間注入すると、AT8による染色を含めて、ADを思わせる組織学的染色がもたらされることがさらに報告された[Arendt et al., Neuroscience 69, 691-698 (1995)]。使用した分析方法にはさらに一連の限界がある。

- 実験は数週間にわたって行なう必要があり、薬剤の発見およびスクリーニングの目的における有用性が大幅に制限される。

- オカダ酸は毒性限界値で適用する必要があるため、多くの動物は任意の分析を行なうことができる前に死亡する。

【0011】

- 長期毒性のため、結果はしばしば再現性に乏しい(本発明者はいずれの結果も完全に反復することはできなかった)。

- 組織中のタウの染色はいずれも、固定効果による人為的なエピトープの露出および/またはマスキングの対象となる。例えば、アルミニウム中毒でもAT8により組織が染色されると報告されているが、抗体Tau-1での染色によりこ

の染色が共局在されると、AD様の効果は明白に除外される。これらの条件下でのAT8（およびTau-1）反応性の誘発は、恐らく生化学的なタウの過剰リン酸化よりも、むしろ、非特異的毒性による正常エピトープの露出に関係している。

【0012】

- ウェスタンブロットでは、正常ラット脳からのタウタンパク質はAT8と反応しなかったが、オカダ酸処置ラットからのタウは強く反応したことが主張されている。タウの正常なAT8反応性の欠如は、文献証拠[Matsuo et al., Neuron 13, 989-1002 (1994)]および本明細書に開示されたデータと明らかな対照をなしている。正常な反応性は死後の脱リン酸化により人為的に失われ、見かけ上の誘発された反応性は、むしろ、ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸の存在により正常な反応性が保全されたものであったという説明が考えられる。

【0013】

- 前者と共に、ADに関連しないAT8反応性の誘発について本出願に記載した観察は、AT8のような抗体を、タウ過剰リン酸化モデルの分析に使用することが、深刻な誤解の対象となることを示している。

【0014】

現在のところ、タウ過剰リン酸化の動物モデルは信頼できる分析ができず、または、発見さえできていない。死後の影響は通常特徴化の段階で厳密に除外されておらず（たとえば[Jicha et al., J. Neurosci. 19, 7486-7494 (1999)]）、使用した抗体のエピトープは、in vivoでの異なる生化学経路の結果である、いくつかのリン酸化またはリン酸化とタンパク質折りたたみの組合せにしばしば依存している[W0 96/04309; Zheng-Fischhofer et al., Eur. J. Biochem. 252, 542-552 (1998); Jieha et al., J. Neurochem. 69, 2087-2095 (1997); Hoffmann et al., Biochemistry 36, 8114-8124 (1997)]。動物において、合理的な時間枠でADの多数の経路をモデル化することは、運頼みの微妙な試みであり、したがって、再現性が乏しいと考えられる。例えば、モノクローナル抗体AT100に対するタウの反応性は、in vitroで再現することが既に極めて難しい[Zheng-Fischhofer et al., Eur. J. Biochem. 252, 542-552 (1998)]。公

知の方法で、アルツハイマー病の状況のモデル化に有益なことが示されたものはない。

【0015】

前記のことは、迅速、簡便かつ信頼でき、同時に、アーティファクトなしに正常を生化学的な異常とはっきり分離する明確なデータの解釈を提供し、無麻酔動物の長期毒性処置の倫理的な制約のない、アルツハイマー病の状況のモデル化のための方法が求められていることを示している。

【0016】

発明の概要

本発明は、アルツハイマー病（AD）の状況をモデル化する方法に関する。

本発明の1つの状況では、a) *in vivo*でのタンパク質ホスファターゼ2A（PP2A）の阻害、b) 脳または脳の特定の領域の外科的摘出、c) 分離した組織のホモジナイズ、超遠心分離または限外濾過、および上清の熱処理、および、d) 可溶性過剰リン酸化タウの存在の評価、を含むアルツハイマー病（AD）の状況をモデル化するための方法が提供される。

【0017】

本発明の方法は、例えば、神経原線維変性およびタウの凝集の過程の重要なステップとしてのタウの異常な過剰リン酸化のモデル化に用いることができる。

本発明は、初めて、動物モデルにおいて可溶性過剰リン酸化タウの存在を評価する方法を提供する。

【0018】

本発明の方法の好ましい態様において、ステップd)は、他のホスホアミノ酸が存在しないリン酸化された配列Asp-(P)Ser-Proを含むペプチド抗原に対して作製したポリクローナルまたはモノクローナル1次抗体で行なう。特に好ましい態様では、ステップd)は、抗ホスホSer422抗体、そして特にmAb AP422抗体で行なう[Hasegawa et al., FEBS Lett. 384, 25-30 (1996)]。

【0019】

抗ホスホSer422（番号はヒトのタウの最も長いアイソフォームによる）は、タウのホスホセリン422に向けられた抗体である。例えば、mAb AP

422抗体は、タウのSer422のリン酸化状態を精査する試薬として特徴化された。これは、そのエピトープがERK2キナーゼによってのみ生成することができ、他のキナーゼによっては生成することができないことで他の抗体と区別される。しかしながら、その、動物モデルの特徴化のための、AT8が最良のもの1つと考えられていた全ての他の真にリン酸化依存性の抗体に対する、特別の有用性は、

(i)他の全ての抗体に比べ、より良好に組織染色が行なえるとは予想されていなかったこと、

(ii)その特性が、ADの脳からの不溶性PHFタウでしか証明されていなかったこと、

が原因で、これまで認識されなかった。

【0020】

本発明はまた、可溶性過剰リン酸化タウの存在の評価ステップが、エピトープのマスキングを避けるために可溶性タウを組織スライスにおだやかに固定し、次に抗ホスホSer422抗体により免疫化学的に分析することにより行なわれる方法にも関する。

好ましい態様では、in vivoでのタンパク質ホスファターゼ2A (PP2A)の阻害は、動物の脳内にオカダ酸を直接注射するか、または、長期間注入することによって行なわれる。

【0021】

別の態様では、in vivoでのタンパク質ホスファターゼ2A (PP2A)の阻害は、ADの病因に関係することが疑わしい導入遺伝子の発現により行なわれる。

好ましい態様では、本発明の方法のステップc)は、分離した組織を、2 μ Mのオカダ酸および2 mMのEDTAおよび500 mMのNaClまたは同等のイオン強度の他の塩を含む、氷冷した中性pHの緩衝液中でホモジナイズすることを含む。

【0022】

より厄介で、現在まで成功していない神経原線維変性の実現とは対照的に、本

発明は、げっ歯類において、神経原線維変性により特徴付けられ、および、それにより時々支配されている種々のヒトの神経変性症状、例えば、AD、前頭葉型痴呆、ピック病、好銀顆粒病および第17番染色体型痴呆[Goedert et al.]に係るような可溶性タウの特徴的な過剰リン酸化をはっきりと分析するための方法を提供する。本発明は、実験動物において短い(日単位の)時間枠内でタウの過剰リン酸化を惹起するために設計された実験の結果を分析するための専用試薬の操作および使用を含む。

【0023】

本発明は、

- ・ 1より多い種類のタウの過剰リン酸化があり、タウのホスホセリン422に向けられた抗体は、真の過程と、疾患に無関係のタウの過剰リン酸化とを区別するが、従来技術で最良のAT8抗体は区別しないこと、
 - ・ タウの過剰リン酸化が、単に不溶性のもつれ(tangle)を形成する種類のタウでなく、ヒトADにおける可溶性の種類タウに関係していること(これは、タウの過剰リン酸化がそれ自体が病的異常であって、単にタウの凝集の副産物ではないこと、つまり、タウ過剰リン酸化のモデル化は、疾患の適切なモデルであることを示す)、
 - ・ in vivoでの過程の解釈を常法において不明瞭にする、ex vivoにおけるリン酸化状況の人為的な変化を防ぐ技術、
 - ・ リン酸化された形態のSer422残基(番号は最長のヒトのタウのスプライスアイソフォームに関係する)を含むタウタンパク質のドメインに向けられた抗体は、in vivoでの真に病的なタウの過剰リン酸化現象の分析にのみ好適であること、
- を示す。

【0024】

本発明は、げっ歯類において病的なタウの過剰リン酸化を迅速かつはっきりと評価することを可能にする分析手段の種類予想外の特性を開示することで、ADに典型的な凝集体におけるタウの過剰リン酸化のモデル化を回避する解決策を提供する。それは、タウのSer422残基のリン酸化(番号はヒトのタウの最

長のアイソフォームに関係する)が、多くのリン酸化ドメインについて見出されているように高度にリン酸化されているだけでなく、タウの可溶状態においてさえも実際、質的に異常である、つまり、この部位では全く正常なレベルのリン酸化がない、という洞察を中心としている。これは、これまで動物モデルの分析において必ずしも認められなかった唯一の識別力および解釈の明確性を提供する。

【0025】

図面の説明

図1は、対照およびアルツハイマー病の脳からの抽出物の耐熱性上清のイムノブロットを示す。上側のパネル：ADにおける神経原線維変性により典型的に重度におかされたヒトの脳の選択した領域からの可溶性熱処理分画(AI+3、A10、A21：ブローカ脳領域、EC：嗅内野)を、60~70kDの見かけ上の分子量(本図で示した)で、典型的なPHF-タウタンパク質「トリプレット」の存在について、モノクローナル抗体AP422により精査した。下側のパネル：個別の患者からの試料の各セットに関して、年齢、死後時間、および、チオフラビンS染色で評価した嗅内野における神経原線維変化の密度を示す。神経原線維変化の密度は、CERAD基準による1=軽度~5=重度のスコアとして反映されている。左から2番目のAD患者は、極めて高齢で、罹患期間が最も長く、恐らく疾患の軽度に攻撃的な進行を反映している一方、神経原線維変化スコアが最も低い右端のAD患者は重度の血管アミロイド症を有しており、AD診断のボーダーラインを構成するケースであることに注目されたい。

【0026】

図2は、2つの異なる脳回収方法によるラット脳における死後の脱リン酸化作用の比較を示す。3ヶ月齢の雌のロングエバンズラットを65mg/kgのペントバルビタールの腹腔内注射により麻酔し、断頭と可能な限り迅速な(約1分)脳の切除(小脳を除く)に供するか、または、循環は無傷のまま頭蓋を外科的に開き、次いで、中大脳動脈離断後に脳を摘出した。脳は、切除後0~10分に氷冷ホモジナイズ緩衝液中で迅速にホモジナイズした。100,000xgで超遠心分離後の上清を煮沸し、可溶性分画の一定部分(それぞれ約3μgのタンパク質)を、リン酸化非依存性ポリクローナルタウ抗体、リン酸化依存性モノクローナル抗

体T a u - 1、P H F - 1、A T 8、および、Zymed社の汎E R Kモノクローナル抗体によるイムノブロットに供した。イムノブロットの関係する部分のみを示した（タウについては60～70 k D、E R Kに関しては40～45 k D）。

【0027】

図3 aは、ラットの脳におけるペントバルビタール下のA T 8およびT a u - 1の免疫反応性の変化を示す。3ヶ月齢の雌のロングエバンスラットに65 mg / k gのペントバルビタールを注射し、15分～5時間後に脳を外科的に摘出した。観察されたタウの免疫化学的变化が、ペントバルビタールにより誘発された急速な脱リン酸化と、それに引き続く、数時間後の正常状態への回復によるものであることを除外するために、1組の動物には、2時間20分後に65 mg / k gのペントバルビタールで2回目の注射を行なった。最初の麻酔から5時間後の動物は、完全に意識が戻っていたので、2回目の麻酔をしなければならなかった。2回目の注射の後に低い状態のリン酸化が観察された場合はなく、観察された効果がリン酸化の増加によることを示している。

【0028】

回収された脳をホモジナイズし、上清を、前記のとおりA T 8およびT a u - 1でイムノブロットした。リン酸化依存性モノクローナル抗体によるシグナル強度を各抽出物中（特異標識）に存在するタウタンパク質の総量に標準化するために、5倍少ないロードの抽出タンパク質によるシスターブロット（sister blot）を、T a u - 1による染色の前に、仔ウシ腸管アルカリホスファターゼによる完全な脱リン酸化に供した。ブロットはE C Lにより現像し（developed）、ブロットの関係する範囲をデンストメータにより走査した。脱リン酸化後のT a u - 1の強度に対するA T 8またはT a u - 1のシグナル強度の比をブロットした。データはそれぞれ3回の実験を表す。

【0029】

図3 bは、モノクローナル抗体A P 4 2 2によるラットの脳のタウのリン酸化の状態の分析を示す。短時間（15分）および延長された時間（5時間、3回）麻酔されたラットから外科的に回収した抽出物をモノクローナル抗体A P 4 2 2でイムノブロットした。等量の正常ラットの脳のタウをin vitroで、精製c d c

2か、または、ERK2により同等の条件下で完全に過剰リン酸化し、参考としてex vivoのタウ試料および同等な量(脱リン酸化後のTau-1による対照染色を参照)のヒトADの脳からの真のPHF-タウと共イムノブロットした(co-immunoblotted)。

【0030】

図4は、ラットの脳スライスにおけるタウ過剰リン酸化の誘発および分析を示す。成体ロングエバンスラットから新鮮に調製した海馬脳スライスを、酸素飽和下、生理緩衝液中で1時間、増加する濃度のオカダ酸と共にインキュベートした。スライスを氷冷停止緩衝液中で短時間の超音波処理にてホモジナイズし、上清を煮沸し、標準モノクローナル抗体Tau-1、AT8およびPHF-1(図4a)、ならびに、AP422(図4b)によるイムノブロットで、耐熱性タウタンパク質について分析した。

【0031】

図5は、オカダ酸の脳内注射後のin vivoでのタウ過剰リン酸化のリン酸化依存性モノクローナル抗体による分析を示す。

a)モノクローナル抗体Tau-1およびAT8による分析。それぞれ3組の3ヶ月齢の雌のロングエバンスラットの基底核内に3µlのビヒクル(3回の反復実験)、または、3µlの50µMのオカダ酸をペントバルビタール麻酔下で注射した。脳を外科的に摘出し、基底核を切除し30~360分後に氷冷停止緩衝液中でホモジナイズした。耐熱性の上清を、Tau-1、AT8により、および、標準化を目的としたブロット上での脱リン酸化後にTau-1により、イムノブロットした。

【0032】

b)ECLにより現像したイムノブロットの関係する範囲をデンストメータにより走査し、AT8のシグナルをホスファターゼ処理したブロットのTau-1シグナルに標準化した。結果は3回の実験を表し、P値はANOVAにより決定した。

c)ビヒクルおよびオカダ酸を注射した基底核の抽出物の一定部分を、モノクローナル抗体AP422によりイムノブロットした。

【0033】

具体的態様の説明

タウ過剰リン酸化 - アルツハイマー病のモデル

A Dおよび種々の類似の疾患における神経原線維変性の過程に関連する不溶性細胞内凝集体は、主に微小管関連タウからなり、この種類のタンパク質が過剰リン酸化状態にあることはよく立証されている。より明白でないのは、過剰リン酸化が凝集の副産物であるのか、または、原因となる出来事として凝集に先行するものであるのかということである。後者の場合は、A Dの脳において可溶性の過剰リン酸化タウ(つまりタウの凝集体に関連しない)が見出されることが予想される。

【0034】

ヒトA Dの脳が、死後少なくとも数時間の遅れなしには決して入手できないため、可溶性脳抽出物におけるA T 8のような抗体に対するタウ反応性の存在は、この反応性が、摘出からのタウの正常なリン酸化を容認する、疾患に関係する死後の脱リン酸化の欠如を常に表す可能性があるので、タウの過剰リン酸化の指標には絶対にならない。また、凝集に依存しない可溶性タウの過剰リン酸化の問題は、A T 8のような抗体で対処することはできないが、正常な哺乳類のタウに対して絶対に反応性がないA P 4 2 2のような抗体を要求する(例3、図3 bを参照)。このような分析的洞察の欠如が、組織染色により検出可能な不溶性凝集体のモデル化による動物モデルの確立に努力を制限していた。

【0035】

予想どおり、A Dの脳からの典型的な凝集体に関連する過剰リン酸化タウがA P 4 2 2と反応することが示された。しかしながら、A Dの脳からの可溶性タウの反応性については確認されていなかった。

実際、超遠心分離によりあらゆる沈殿可能な物質を慎重に除去した後には得られたヒトA Dの脳の上清中のタウタンパク質はA P 4 2 2と反応性であるが、対応した年齢の患者からの無疾患の対照試料における反応性は本質的に欠如している(例1、図1：特に疑わしい嗅内野における弱い反応性は、老齢患者において極めて高頻度である無症状性の再生を表すかも知れず、または、極めて早いステー

ジのADを表しているかも知れない)。

【0036】

ADの脳からの可溶状態の真の過剰リン酸化タウの証明は、何週間または何ヶ月もかかるかも知れない、または、配列の違いによりヒトでない任意の種類タウには決して生じないかも知れない凝集のモデル化を要しない、重要な疾患の過程のモデルとしてのタウ過剰リン酸化の動物モデルの有用性を正当化する。

【0037】

ラットの脳における真のAD様タウ過剰リン酸化の検出および分析

げっ歯類から脳を得るための通常の手順は、麻酔下(例えばペントバルビタール)での断頭後に頭蓋を解剖することである。この手順は、摘出した脳がその後の処理に使用可能になるまで2~3分を要するかもしれない。ADの病理にとって有用なホスホタンパク質、つまりタウおよびERK2キナーゼのリン酸化の状態を、数種類の関連するリン酸化依存性抗体との反応性によりモニターすると、脳が摘出され、分析が可能になってから数分以内に、脱リン酸化への単一の傾向が検出される(例2、図2)。

【0038】

モノクローナル抗体PHF-1およびAT8との反応性の減少、モノクローナル抗体Tau-1の反応性の増加、および、SDS-PAGE上における高いゲル移動性を有する種類のタウの形成があり、全てがタウの脱リン酸化を示すものである。ERK2のリン酸化の状態はSDS-PAGE上のゲル移動度で、そして、反応性は該キナーゼの2重リン酸化された調節TEYモチーフに向けた特異抗体でモニターした。ほとんど全ての種類のERK2がex vivoで高い移動度形態で見出されており、該キナーゼ集団が主として不活性状態にあることが示唆されると考えられる。タウと同様に、さらなる脱リン酸化/不活性化が、摘出後数分で見られた。

【0039】

上記の手順では、モニタリングに供される脱リン酸化現象が数分の時間枠で起こることを考慮すると、脱リン酸化が、脳の摘出に要する数分の時間枠の間に既に起こっているということを外れできない。したがって、摘出時間をなくすこと

が必須である。

【0040】

ラットを65 mg / kgのペントバルビタールで10分より長くない時間深麻酔した後、頭蓋を外科的に開き、循環を完全に維持したまま脳全体を露出した。大脳動脈を離断した後、脳を直ちにホスファターゼ阻害剤およびマグネシウムの錯化剤を含む氷冷緩衝液中で直ちにホモジナイズすることにより、摘出後5秒以内にすべてのホスファターゼおよびキナーゼ活性を効果的に停止することができる。この実験系では、しかしながら、タウならびにERK2のリン酸化状態は、脳が摘出後15分までにホモジナイズされたときでさえ認め得るほどには変化しておらず、断頭後に見られた死後の脱リン酸化が、生きたラットから脳が外科的に摘出された場合は全く起こらなかったことを示している(例2、図2)。この手順は、実験上の脱リン酸化のアーティファクトを回避し、したがって、*in vivo*における正常または異常なリン酸化現象のあらゆる有効な分析にとって必要な前提条件である。

【0041】

ERK2のリン酸化/活性化状態の分析は、脳摘出のアーティファクトを回避する重要性を最も明白に証明している。断頭後の最も迅速な摘出でさえ、ERK2を任意の有意なリン酸化/活性化レベルで捕らえることは不可能であった。しかしながら、外科的に摘出した脳の*ex vivo*での分析は、脳内のほとんど半数のERK2集団の構成的なリン酸化および活性化は正常な現象であることを示しており、このタイプのキナーゼの構成的な活性化が、以前に癌細胞でしか記載されていなかったことを考慮すると、これは驚くべきことである。

【0042】

ラットのペントバルビタールへの15分を超える延長された暴露は、AT8の反応性の増加と、それに相関したTau-1のタウの反応性の減少を示す結果となり、リン酸化の漸進的な増加を示している(例3、図3a)。タウの全免疫反応性に標準化したAT8の反応性は、5時間後には5倍以上増加し、ADの脳から分離したPHF関連タウで見られたレベルに近づいている。ラットは、この時間の後に意識を回復し、異常な自発的症候を示さなかった。当該分野で一般的に

認められている標準としてのAT8およびTau-1の免疫反応性を基準に判断すると、AD様のタウの過剰リン酸化はラットの脳において、延長されたペントバルビタール処置により誘発されたものである。

【0043】

他のホスホアミノ酸が存在しない、リン酸化された配列Asp-(P)Ser-Proを含むペプチド抗原に対して作製したポリクローナルまたはモノクローナル抗体、特に抗体mAb AP422を使ってのみ、ペントバルビタール誘発性のタウ過剰リン酸化が、ADにおけるタウのリン酸化と完全に無関係であることを明確化することが可能である。

【0044】

従来技術の最良のモノクローナル抗体としてのAT8とは異なり、死後の脱リン酸化を欠く（摘出時間5秒、外科的脳摘出）正常ラットのタウのAP422に対する反応性は全く見られず、タウのペントバルビタール誘発性過剰リン酸化後も依然として見られなかった（例3、図3b）。

これに対し、ヒトADの脳からのPHF-タウは、AP422と強力に反応した。ラットのタウの完全に病的なAP422の反応性は、*in vitro*で精製ERK2による正常ラットの脳のタウのリン酸化により誘発することができるため、この違いは、ラットからのタウとヒトからのタウとの種類の違いによっては説明できない。

【0045】

異なるタイプのタウの過剰リン酸化間の抗ホスホSer422の独自の識別力は、動物モデルの有効かつ便利な分析にとって必須である。生物モデル系においてタウの過剰リン酸化を誘発する最も簡単な手段は、PP2Aの阻害、例えばオカダ酸による阻害である。*in vitro*の細胞系、例えば脳スライスでは、AT8はタウの過剰リン酸化を検出し、モニターするのに十分である（例4、図4a）。AP422の反応性もオカダ酸によって良好に誘発され（図4b）、ADの病理生理学に関する過程のための最も識別性のある基準を満足する。シグナルが小さく、*in vivo*での変化性が高く、麻醉法によりタウの潜在的なリン酸化が変化するため、AT8のような抗体を脳におけるホスファターゼ阻害剤誘発性リン酸化

効果の分析に使用することは除外される。

【0046】

生物系で真に病的なタウの過剰リン酸化を誘発する他の公知の方法がないので、分析上の制限は、タウ過剰リン酸化の動物モデルを入手することが全くできないことに等しい。しかも、AT8の反応性は単に試料中に存在するタウタンパク質の量によって変わることがある。したがって、リン酸化状態の比較を可能にするために、AT8のシグナルは、リン酸化非依存性抗体により、または、タウのリン酸化を酵素的に除去した後（例えばプロットのホスファターゼによる処置）におけるイムノプロットにより評価した、タウの総免疫反応性に対して標準化する必要がある。図5aにおける、オカダ酸注射後のAT8のイムノプロットの検討、および、図5bにおける標準定量化されたデータと図3aとの比較は、オカダ酸のいずれの特異的効果も見分けられないことを示している。事実、変動があまりにも劇的に増加したため、いずれの有用な有意性もほとんど適用することができなかった。したがって、どの個別の動物または動物群が病的なタウの過剰リン酸化をもたらしたかを示すことはできない。

【0047】

これに対し、同一の脳抽出試料をAP422で分析した場合、真のAD様タウ過剰リン酸化は、個別の動物において、事実上バックグラウンドなしに明白に検出できる。in vivoでのタウ過剰リン酸化が、常にはオカダ酸に反応して生じないという事実（例5、図c）は、細胞系（脳スライスを含む）が通常例外なく反応するため、驚くべきことである。in vivoでのこの変化性の原因は今のところ未知であるが、この変化のはっきりした検出は、ホスホSer422に向けられた抗体の識別力を立証するものであり、タウの過剰リン酸化がin vivoでの取るに足りない反応ではないことを示す。

【0048】

タウのリン酸化されたSer422に向けられた抗体は、ADに関係するタウの生化学についての動物モデルの正確な分析においては中心的ではないとしても、優れた有用性を有する。

トランスジェニック動物の場合は数年かかるのに対し、数日以内で行うことが

できる、本発明の方法による *in vivo*でのこの現象の評価能力は、多様な目的に関して大きな有用性を有している。

【0049】

・タウ過剰リン酸化を阻害する薬剤、特に ERK2 の阻害剤およびその調節剤の効果および血管脳関門通過の試験。

・AD様のタウ過剰リン酸化を実験するための遺伝子背景および神経の感受性を調節する疑いのある遺伝子の決定。

・実験種および系の選択。

・タウ過剰リン酸化を調節する環境因子の同定。

・タウ過剰リン酸化を調節する体液因子の同定。

・タウ過剰リン酸化に影響する調節経路および因子の同定および追跡。

【0050】

発明の手法

小動物（例えばラットおよびマウス）を、*in vivo*におけるタウの過剰リン酸化を起こすための処置に供する。このような処置は、直接的な、または、間接的な方法からなってもよい。直接的な方法は、動物の脳への薬剤または毒物の直接注射または長期にわたる注入からなってもよい。間接的な方法は、ADの病因に関連していることが疑わしい導入遺伝子の発現からなってもよい。

【0051】

分析は以下のように行なってもよい。

動物を、当該分野で普通に用いられている、バルビツレート、ケタミン、ハロタン、イソフルランを含むがこれらに限定されない剤で麻酔する。頭蓋を外科的に開き、中大脳動脈を離断した後に脳を摘出する。所望するなら、脳の特別な領域を数分以内に剖出してもよい。次に、分離した組織を、キナーゼおよびホスファターゼをブロックするための2 μ Mのオカダ酸および2 mMのEDTA、タンパク質分解活性をブロックするためのプロテアーゼ阻害剤、および500 mMのNaClまたは同等のイオン強度の他の塩を含む中性pHの少量の氷冷緩衝液中でホモジナイズする。ホモジネートを100,000 \times gで30分間遠心分離し、上清を10分煮沸した。凝固タンパク質を16,000 \times gの遠心分離で除去し、耐熱性タ

ンパク質を含む上清を、中性の低イオン強度の緩衝液中で透析した。SDS-PAGE分析およびイムノブロットで必要なため、試料を限外濾過により濃縮した。

【0052】

イムノブロットにおけるタウタンパク質のリン酸化状態は、他のホスホアミノ酸が存在しないリン酸化された配列Asp- (P) Ser-Proを含むペプチド性抗原に対して作製したポリクローナルまたはモノクローナル1次抗体により評価した。抗体はビオチン、ジギトキシゲニン、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、放射性同位体、または当該分野で通常用いられているその他の任意の方法によって直接標識されていてもよく、または、同様に標識された2次抗体によって標識されていてもよい。可溶性過剰リン酸化タウの存在を評価するための同等の方法、例えば、エピトープのマスキングを回避するために可溶性タウを組織スライスに弱く固定し、その後、抗ホスホSer422抗体で免疫化学的に分析する方法を用いてもよい。可溶性の種類タウの固定は、リン酸緩衝液中のパラホルムアルデヒド/グルタルアルデヒドの氷冷混合液[Dotti et al., Neuroscience 23, 121-130 (1987)], ペリオデート/リジン/パラホルムアルデヒド[Pollock and Wood, J. Histochem. Cytochem. 36, 1117-1121 (1988)]または類似の作用の弱い固定剤への短い暴露により行ってもよい。

【0053】

本発明を以下の例により説明するが、決してそれを限定することを意図してはいない。

【0054】

例

例1

神経病理学的検査で確認されたADを有するまたは有しない剖検したヒトの脳からの小組織試料を-78℃で粉末化し、2mlの氷冷ホモジナイズ緩衝液中、音波処理によりホモジナイズした。不溶性の物質を120,000×g、30分の遠心分離で除去し、上清を5分煮沸した後、13,000×gで5分間遠心分離し、耐熱性上清を生じた。試料を低塩緩衝液(10mM BisTris、pH7.0、1

mM EDTA) 中で透析した。ブロードマン領域 A1 + 3、A10、A21 および嗅内野からの、約 15 μ g のタンパク質に相当する試料の一定部分を 10% SDS-PAGE (Novex) で分離し、ニトロセルロースにイムノプロットした。膜を 3% BSA (Sigma、免役グロブリン非含有等級)、10 mM PBS、pH 7.2 (ブロッキング緩衝液) で1時間ブロッキングした。プロットを、10 mM PBS、pH 7.2、0.5% Triton X100、2% 正常ヤギ血清 (2次抗体については5%) 中の AP422 で1晩インキュベートし、同じ緩衝液で数回洗浄し、ECL (化学発光増幅) ウェスタンプロットプロトコル (Amersham Life Science) を用い、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗マウス2次抗体 (1:3,000) で現像した。

【0055】

例2

3ヶ月齢の雌のロングエバンスラットを 65 mg/kg のペントバルビタールの腹腔内投与で麻酔した。10~15分後にラットを断頭し、脳を可能な限り迅速に (約1分) 切除するか、または、5分までのさらなる猶予を設けて切除した。小脳を除去した後、脳を下記のごとく処理した。

あるいは、麻酔したラットの頭蓋を、循環を維持したまま外科的に開き、脊髄を離断後直ちに脳を摘出した (例5参照)。小脳を除去した後、皮質を直ちに、または、10分までの時間室温に放置した後に処理した。

【0056】

脳を、4 ml の氷冷したホモジナイズ緩衝液 (100 mM KH_2PO_4 、pH 6.5、2 mM EGTA、2 mM EDTA、0.5 mM PMSF、2 μ M オカダ酸、および、10 μ g/ml ロイペプチン) 中で Ultra-Turax によりホモジナイズし、次いで、16,000 \times g、4 で30分遠心分離した。一定部分を採取し、ERK イムノプロット用の等量の Laemmli SDS 試料緩衝液と共に煮沸した。上清の残りを5分間煮沸し、不溶性物質を16,000 \times g、30分の遠心分離で除去した。耐熱性上清を低塩緩衝液 (10 mM BisTris、pH 7.0、1 mM EDTA) 中で透析し、15 μ g のタンパク質を含む一定部分を 10% SDS-PAGE で分離し、次いで、ニトロセルロース上で1晩、4 でイムノプロ

ットした。プロットをブロッキング緩衝液で1時間ブロッキングし、洗浄し、そして、10mM PBS、pH7.2、0.5% Triton X100、1% BSA中の以下の抗体と共に少なくとも4時間インキュベートした。リン酸化非依存性ポリクローナル抗体である抗タウ256-273 (1:1,000)、1:5,000のTau-1 (Boehringer Mannheim)、1:1,000のPHF-1、および、1:200のAT8 (Biosource International)。

【0057】

ERKのプロットについては、試料を12% SDS-PAGE (Novex) で分析し、ニトロセルロースにトランスファーした。ブロッキング後、プロットを1:5,000の抗ERKモノクローナル抗体Z033 (Zymed) と共にインキュベートした。

10mM PBS、pH7.2、0.5% Triton X100中で繰り返し洗浄後、1-3,000のアルカリホスファターゼ共役ヤギ (ウサギポリクローナル1次抗体の場合)、または、ウサギ (マウスモノクローナル1次抗体の場合) と共に1晩インキュベート後に、ニトロブルーテトラゾリウム染色キット (Life Technologies) により、1次抗体を検出した。

【0058】

例3

3ヶ月齢の雌のロングエバンスラットを65mg/kgのペントバルビタールの腹腔内投与で麻醉後、15~300分間放置し、その後、脳を外科的に摘出した。摘出が最初の麻醉から2時間後またはそれ以降に行なわれる場合は、脳摘出の直前に2回目の麻醉を投与した。例2のとおり、皮質を処理し、タウタンパク質をモノクローナル抗体Tau-1およびAT8を用いてウエスタンブロットにより分析した。タウのリン酸化の定量的な免疫化学的評価を可能にするために、5倍少ないタンパク質をロードした全ての試料の姉妹プロットを完全な脱リン酸化に供し、Tau-1による染色を用いたタウタンパク質の総ロードについての相対的指標を得た。BSAでブロッキングしたプロットを、5mlの50mM TBS、pH8.5、0.1mM EDTA中の100U/mlのアルカリホスファターゼ (Gibco BRL) と共に、37℃で16時間インキュベートした。

【0059】

全てのプロットをHRP結合ヒツジ抗マウスポリクローナル2次抗体によりECLプロトコルを用いて現像した。比較可能性を確保するため、一連の実験によるプロットを各抗体について同一の方法で厳密に共現像した (codeveloped)。シグナルはKODAK X-OMAT科学的イメージングフィルムで補足し、デンシトメータによる走査およびNIH image 1.44による画像分析によって定量した。リン酸化のレベルは、存在するタウタンパク質の量にシグナルを標準化するため、プロットしたタウタンパク質を酵素的に脱リン酸化した後のTau-1によるリン酸化非依存性シグナルに対する、Tau-1またはAT8のリン酸化依存性免疫シグナルの比にしてからプロットした (図3a)。

【0060】

AT8とAP422の性能を比較し、より正確にタウのリン酸化現象を解釈するために、AT8/Tau-1で分析した試料の選択した一部分を、例1に記載したとおりにAP422によるイムノプロットでも分析した。参照のために、同等な量の正常ラットのタウタンパク質 (ペントバルビタール麻酔の15分後) を、過剰のcdc2キナーゼおよびウシの脳からのERK2キナーゼPK40と共に、50mM HEPES、pH7.0、2mM Mg²⁺、1mM ATP、1mM DTT中37°Cで1晩インキュベートした。キナーゼの反応はSDS-PAGEでの分析の前にSDS-PAGE試料緩衝液により停止した。真のヒトADタウのさらなる標準として、サルコシル不溶PHFタウ標本からの部分的に再可溶化した過剰リン酸化タウ分画を、同一のイムノプロットに平行してロードした (図3b)。

【0061】

例4

成体雄ロングエバンスラットをCO₂で麻酔し、断頭した。脳を2分以内で摘出し、海馬を鈍性のスパーテルを用いて剖出した。海馬を、McIlwainテッシュチョッパで0.45mmのスライスにカットし、氷冷低Ca²⁺クレブス重炭酸イオン緩衝液 (pH7.0) : 124mM NaCl、3.33mM KCl、0.01mM Ca²⁺、1.25mM KH₂PO₄、1.33mM Mg

SO₄、2.5-7 mM NaHCO₃、10 mM D-グルコース、20 mM HEPES中に設置した。5-8枚のスライスを5 mlの低Ca²⁺緩衝液入りのチューブに設置し、少なくとも30分間、33-34℃、水飽和酸素化(water saturated oxygenation)状態(95% O₂、5% CO₂)でインキュベートした。30分後、溶液を生理学的レベルのCa²⁺(1-3 mM)を含む緩衝液と交換し、さらに30分間インキュベートした。

【0062】

少なくとも1時間の総平衡時間の後、スライスを10 mMまでの増大する濃度のオカダ酸に90分間暴露した。この処置後、緩衝液を除去し、タンパク分解酵素阻害剤のカクテル(100 μM PMSF、10 μg/ml アプロチニン、10 μM ロイペプチン、6 μg/ml ペプスタチン、40 μM キモスタチン)を含む0.5 mlのホモジナイズ緩衝液(例2を参照)中で、スライスを10-20秒間音波処理した。ホモジネートを、16,000で30分遠心分離し、上清を回収し、100℃で5分間加熱し、再度遠心分離した。タンパク質含量について標準化した耐熱性上清の一定部分を10% SDS-PAGEで分析し、次いで、モノクローナル抗体AT8(1:200)およびAP422(1:5,000)でイムノプロットした。プロットをECL(Amersham Life Sciences)で現像し、Kodak X-OMAT ARフィルムに露光させた。

【0063】

例5

月齢約3-4ヶ月の雄または雌のロングエバンスラットを組にして食餌および水を自由に与えて飼育した。動物をペントバルビタール(65 mg/kg、腹腔内注射)で深麻酔し、次いで、脳内にオカダ酸を注射した。頭皮に小切開を加え、頭蓋を露出した。組織を鉗子で術野の外に保持し、注射範囲をマークした。開口を、頭蓋を介して歯科用ドリルおよび5番のカーバイドバーで形成した。微小注射ユニット(model 5000; David Kopf Instruments)に取付けた10 μlのハミルトン注射器を用いて、ビヒクル(10 mM PBS、pH 7.2)中の100 μMのオカダ酸を2.5 μl、基底核(位置はブレグマから-0.18 mm AP、+/-0.30 mm、および硬膜から-0.69 mm)に微小注射した。

【0064】

2.5 μ lの液体の注入時間は約10分であった。オカダ酸の注射から30～360分後、ラットを外科的脳摘出法に供した。手術を最初の麻酔薬の投与から2時間より後に行なう場合、2回目のペントバルビタールの注射を腹腔内に行なった。各実験条件は、3頭の動物の組で行なった。対照は、同量のビヒクルを注射したもの、または、全く注射をしなかったものを含む。

【0065】

外科手術は、Kopfの定位固定装置にて行なった(model 900; David Kopf Instruments, Tujunga, CA)。頭皮に拡大した切開を加え、皮膚を側方に押しやり、鉗子で術野の外に保持した。微小解剖穿孔器アタッチメント(10mm)付の歯科用ドリルを用いて頭蓋を除去し、脳への自由な到達を可能にした。脳を脊髄から切断し、次いで、基底核を3×3mmの組織ブロックとして摘出し、それを直ちに0.5mlの氷冷ホモジナイズ緩衝液中で音波処理によりホモジナイズした(例2参照)。抽出物を例4に記載したとおりに遠心分離し、熱処理した。

【0066】

3回の実験の耐熱性上清をAT8(図5a)およびAP422(図5c)でのイムノプロットにより分析した。AT8のシグナルを、例3に記載のごとくホスファターゼ処理プロットのTau-1の免疫反応性に標準化した後で定量した。こうした比(n=3)の平均を、標準的なANOVA分析(図5b)で有意性について検定した(図5b)。

【図面の簡単な説明】

【図1】

対照およびアルツハイマー病の脳からの抽出物の耐熱性上清のイムノプロットを示した図である。

【図2】

2つの異なる脳回収方法によるラット脳における死後脱リン酸化作用の比較を示した図である。

【図3a】

ラットの脳におけるペントバルビタール下のAT8およびTau-1の免疫反

応性の変化を示した図である。

【図3b】

モノクローナル抗体A P 4 2 2によるラットの脳のタウのリン酸化の状態の分析を示した図である。

【図4a】

ラット脳スライスにおけるタウ過剰リン酸化の誘発およびT a u - 1、A T 8およびP H F - 1による分析を示した図である。

【図4b】

ラット脳スライスにおけるタウ過剰リン酸化の誘発およびA P 4 2 2による分析を示した図である。

【図5a】

オカダ酸の脳内注射後のin vivoでのタウ過剰リン酸化のT a u - 1およびA T 8による分析を示した図である。

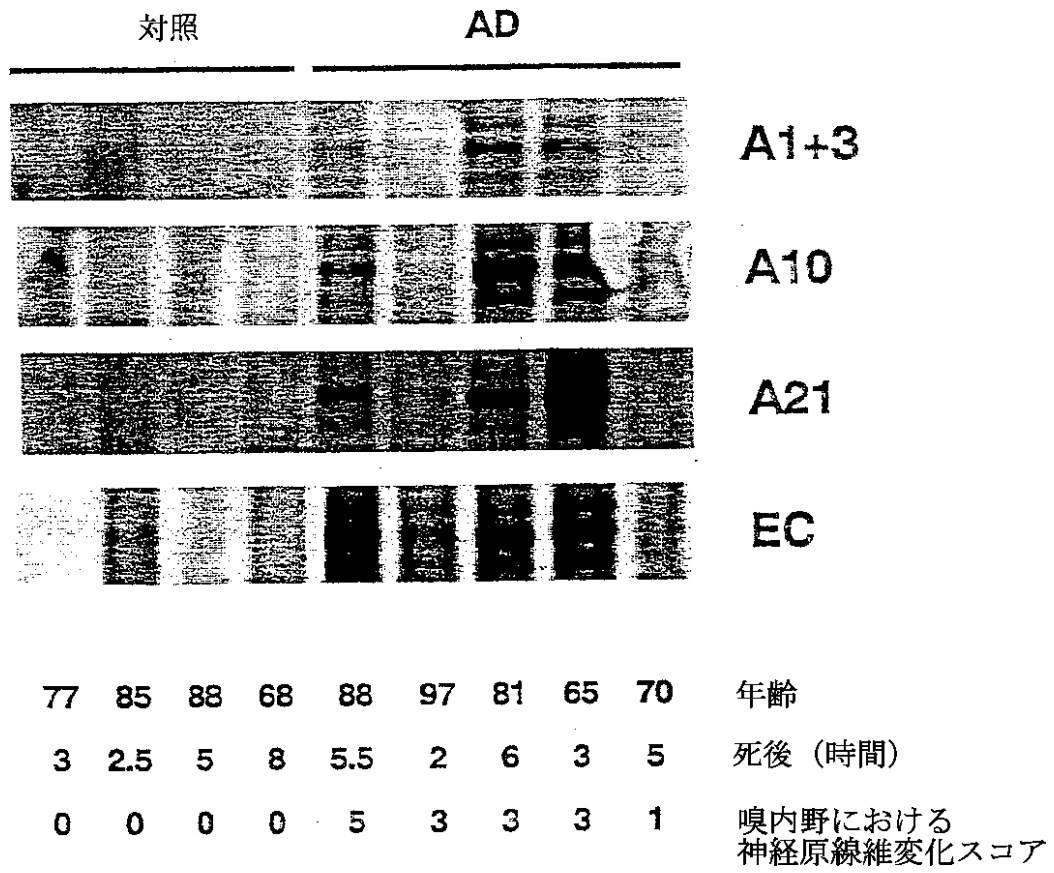
【図5b】

A T 8のシグナルをホスファターゼ処理したプロットのT a u - 1のシグナルに標準化したグラフである。

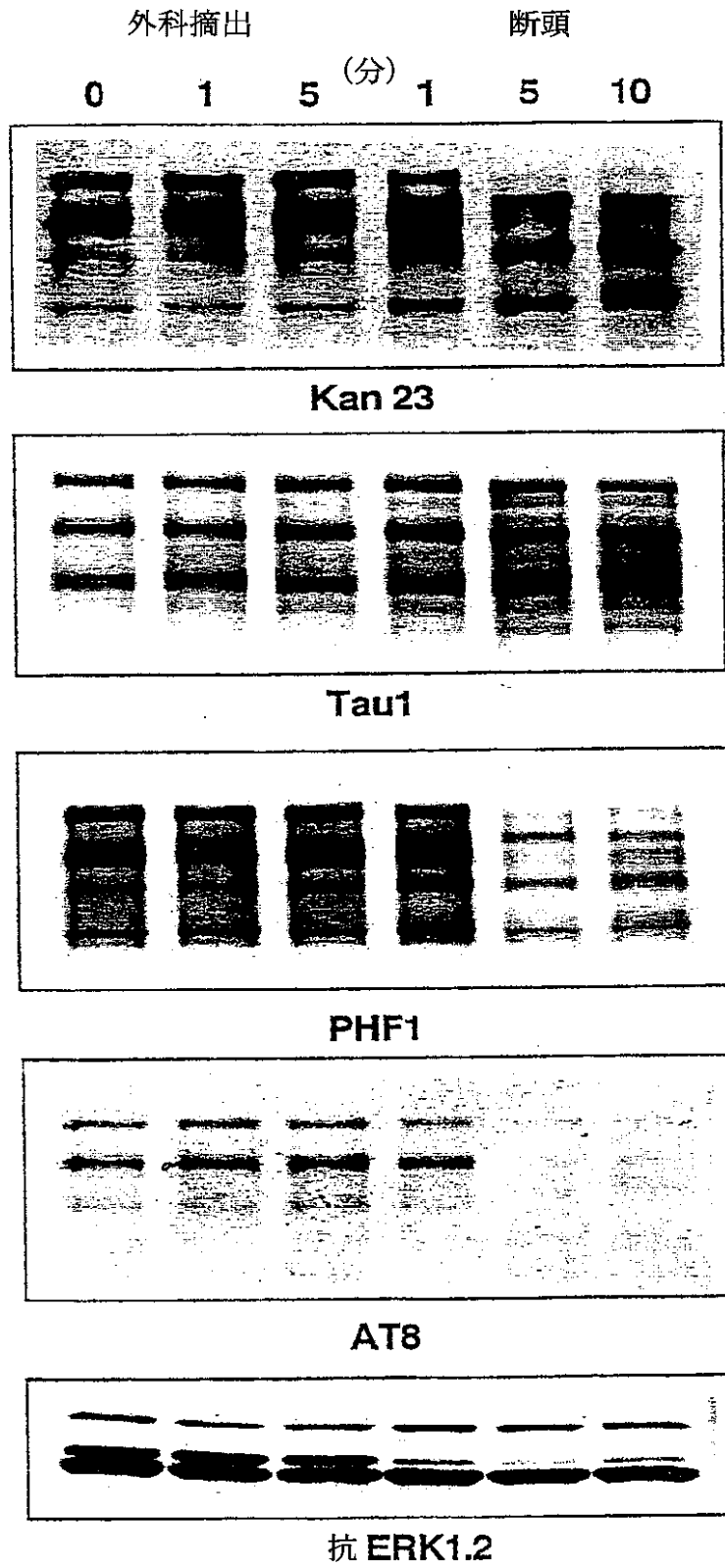
【図5c】

ビヒクルおよびオカダ酸を注射した基底核の抽出物の一定部分をモノクローナル抗体A P 4 2 2により分析した図である。

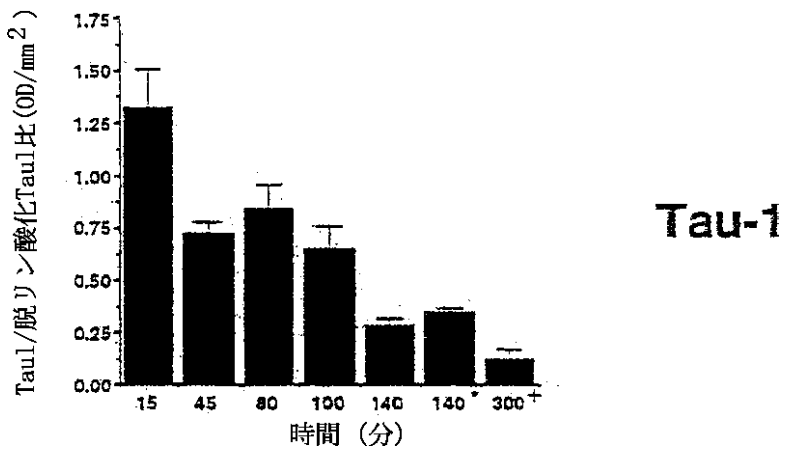
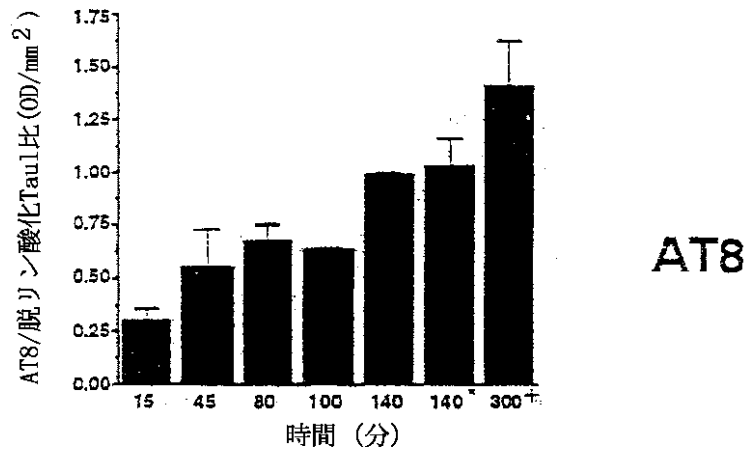
【図1】



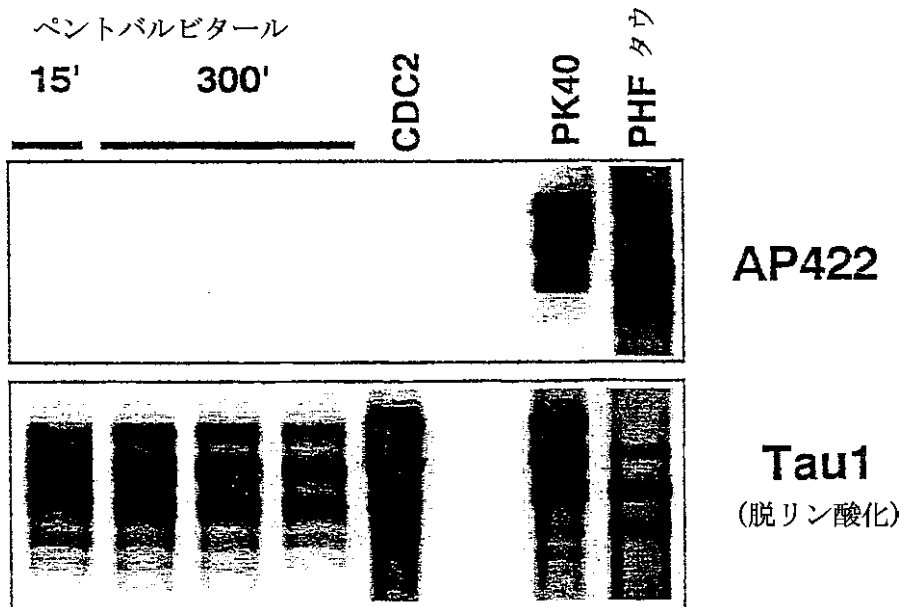
【图2】



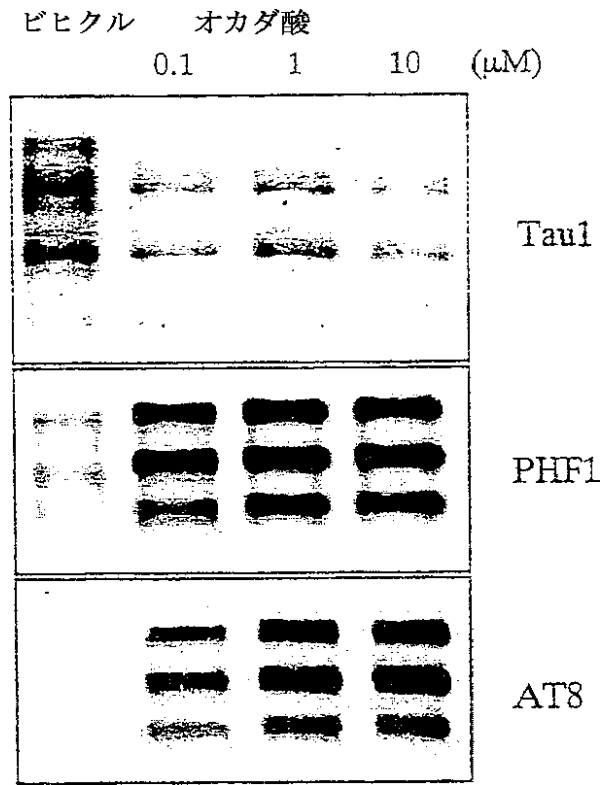
【図3a】



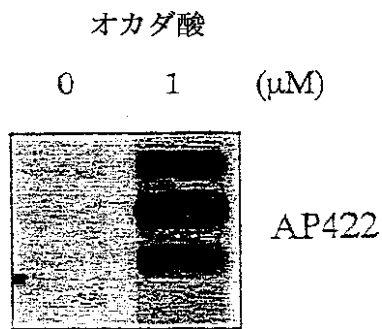
【図3b】



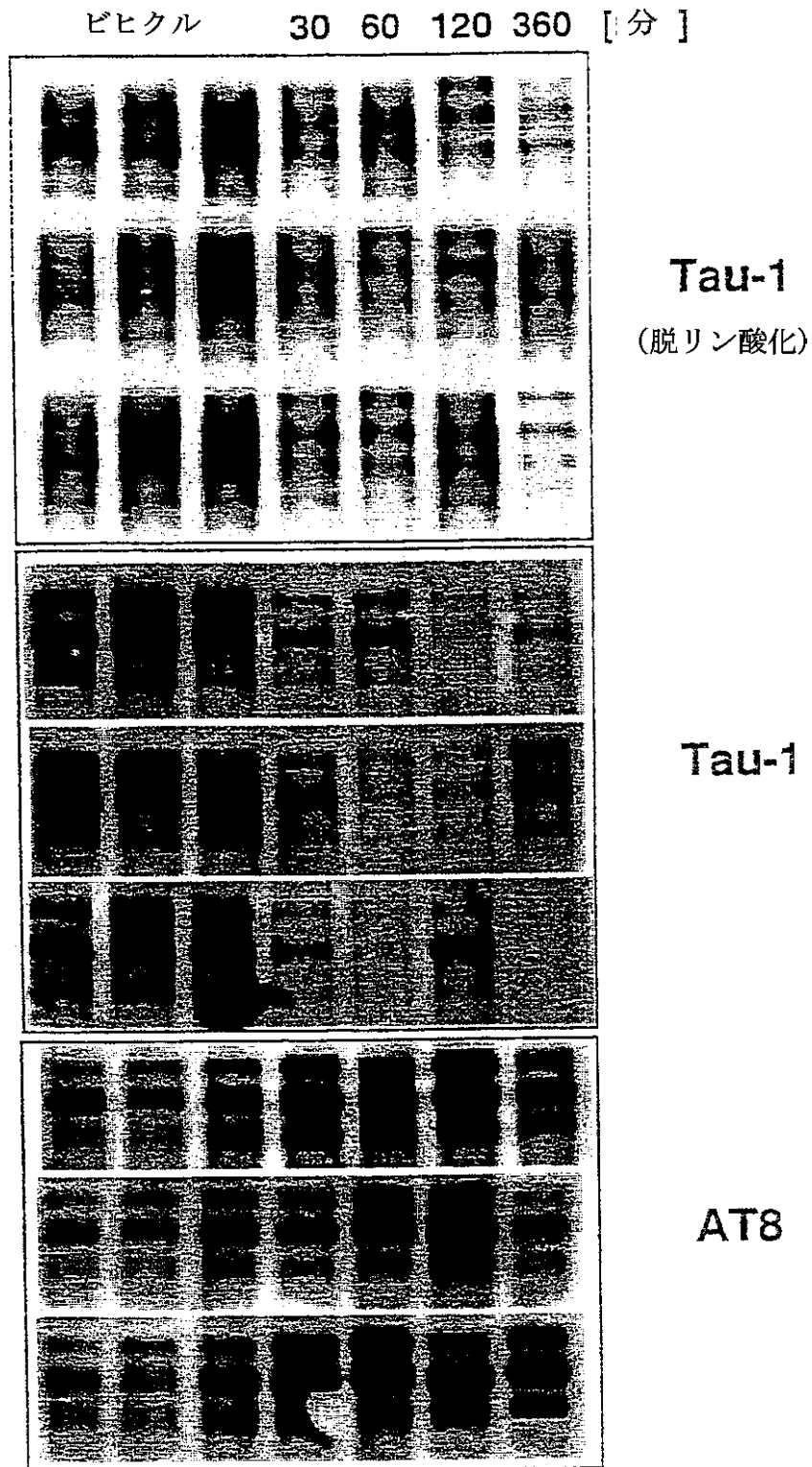
【図4 a】



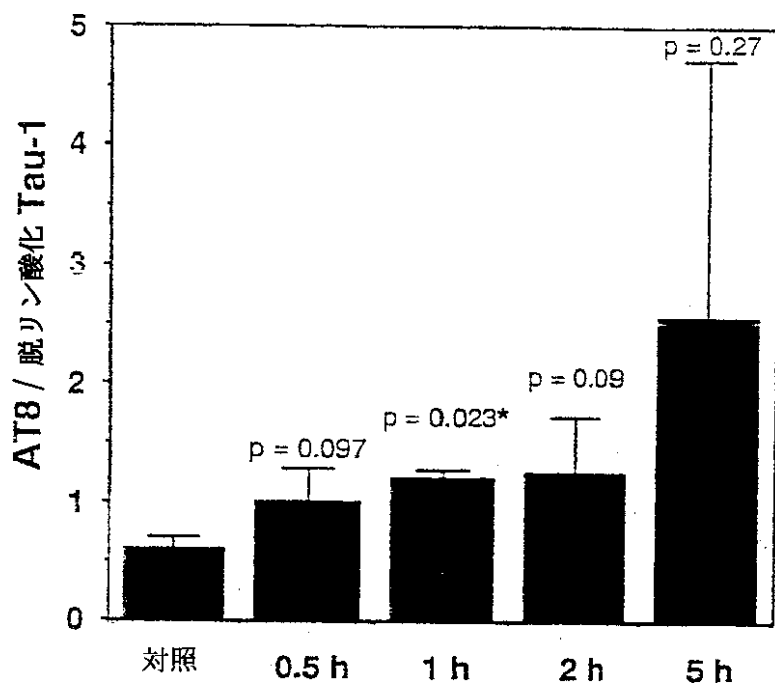
【図4 b】



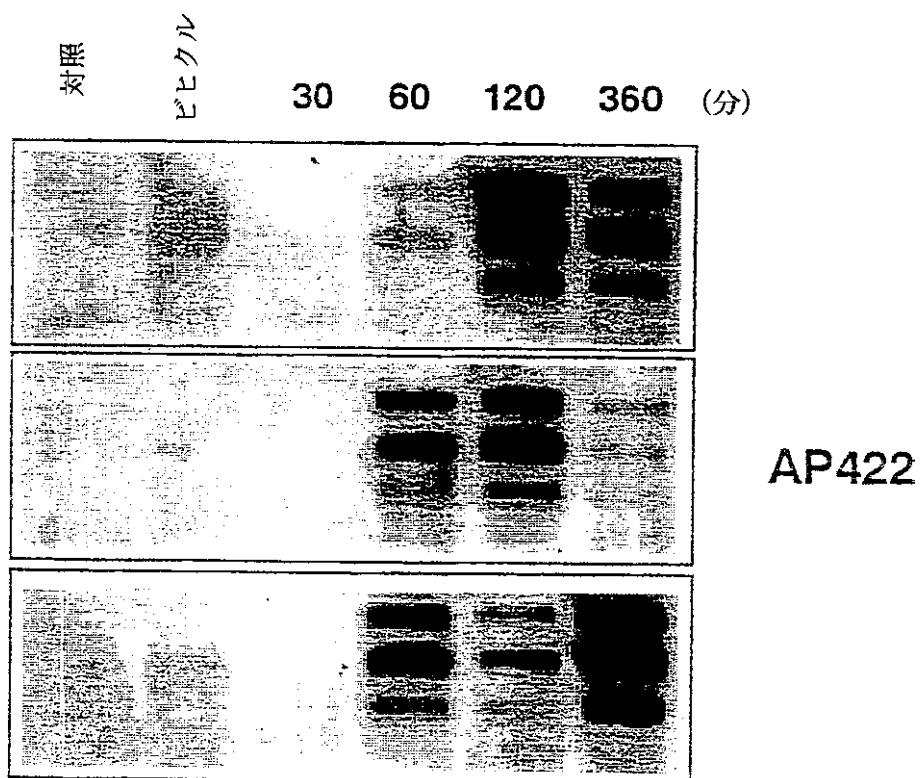
【図5a】



【図5b】



【図5c】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PC1/EP 01/01053
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/68 C07K14/47 C07K16/18		
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 601N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GONG C X ET AL: "DEPHOSPHORYLATION OF ALZHEIMER'S DISEASE ABNORMALLY PHOSPHORYLATED TAU BY PROTEIN PHOSPHATASE-2A" NEUROSCIENCE,US,NEW YORK, NY, vol. 61, no. 4, 1994, pages 765-772, XP000578896 ISSN: 0306-4522 abstract page 764, right-hand column, paragraph 3 page 766, left-hand column, paragraph 1 page 766, right-hand column -page 767, left-hand column page 770, right-hand column, paragraph 1 page 771, left-hand column, paragraph 1 --- -/-	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 25 July 2001		Date of mailing of the international search report 31/07/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Goetz, M

I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/EP 01/01053

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 LEDESMA M DOLORES ET AL: "Isolation of a phosphorylated soluble tau fraction from Alzheimer's disease brain." Database accession no. PREV199598430679 XP002142567 abstract & NEUROBIOLOGY OF AGING, vol. 16, no. 4, 1995, pages 515-522, ISSN: 0197-4580</p> <p>---</p>	1-10
Y	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; IOBAL K ET AL: "Mechanism of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease." retrieved from STN Database accession no. 95194583 XP002142568 abstract & MOLECULAR NEUROBIOLOGY, (1994 AUG-DEC) 9 (1-3) 119-23.,</p> <p>---</p>	1-10
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1993 SAUTIERE PIERRE-ERIC ET AL: "Alzheimer-type Tau epitopes detection after okadaic acid treatment of neuroblastoma cells." Database accession no. PREV199396066885 XP002142569 abstract & COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III SCIENCES DE LA VIE, vol. 316, no. 5, 1993, pages 533-535, ISSN: 0764-4469</p> <p>---</p>	1-10
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 HASEGAWA M ET AL: "Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein." Database accession no. PREV199698785963 XP002142570 abstract & FEBS LETTERS, vol. 384, no. 1, 1996, pages 25-30, ISSN: 0014-5793</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	2,3

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC1/EP 01/01053

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^o	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOHNSON, GAIL V. W. ET AL: "Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain" ALZHEIMER'S DIS. REV. 'ELECTRONIC PUBLICATION' (1996), 1(1/2), 38-54, XP002142566 the whole document	1-10

I

フロントページの続き

(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, 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

专利名称(译)	评价神经原纤维变性动物模型的分析方法		
公开(公告)号	JP2003521713A	公开(公告)日	2003-07-15
申请号	JP2001556331	申请日	2001-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	Naddoage		
申请(专利权)人(译)	Naddo AG		
[标]发明人	ローダーハンノ		
发明人	ローダー,ハンノ		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 C07K16/18		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/CB26 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03		
优先权	2000102057 2000-02-02 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及对阿尔茨海默氏病 (AD) 的状况进行建模的方法。特别地, 本发明涉及对tau的异常过度磷酸化建模的方法, 其是神经原纤维变性和tau聚集过程中的关键步骤。

