

(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 - 504606

(P2003 - 504606A)

(43)公表日 平成15年2月4日(2003.2.4)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* ( 参考 )
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	W 2 G 0 4 5 V 4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/132		A 6 1 K 31/132	4 C 0 8 4
31/198		31/198	4 C 0 8 5
31/203		31/203	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 29数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 509549(P2001 - 509549)

(86)(22)出願日 平成12年7月7日(2000.7.7)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月9日(2002.1.9)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/06730

(87)国際公開番号 W001/004349

(87)国際公開日 平成13年1月18日(2001.1.18)

(31)優先権主張番号 99401742.4

(32)優先日 平成11年7月9日(1999.7.9)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 アンスティテュ パストゥール ドゥ リル  
 INSTITUT PASTEUR D  
 E L I L L E  
 フランス国・59019 リル セデ・リュ デ  
 ユ プロフェッスール カルメット,1

(71)出願人 サントル オスピタリエ ユニベルシテール  
 ボドワ ドゥ ローザンヌ  
 スイス国,ツェーハー - 1011 ローザンヌ,  
 リュ ドゥ プニョン,9

(74)代理人 弁理士 石田 敬 ( 外 4 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルツハイマー病の診断または予知の方法とアルツハイマー病の予防または治療用組成物

(57)【要約】

本発明は、アルツハイマー病 ( A D ) を有する患者の、または A D を発症する被験者の危険度の増大を予知する方法に関するものであり、 a ) D N A を含有する生体試料を A P O E 遺伝子のアレレに関して検定すること、および b ) タンパク質 L p ( a ) または糖タンパク質アポ ( a ) の血漿量を検定することを含み、 A P O E 遺伝子の 4 アレレの存在および [ L p ( a ) ] / アポ ( a ) の血漿量の増加によりアルツハイマー病を有するまたは A D を発症する患者の危険度の増大を表示する。本発明はさらに、少なくとも 1 種類の A P O E 4 アレレを保有する患者において、 L p ( a ) の血漿量または L p ( a ) とその受容体との相互作用を低減させることからなる A D の予防または治療のための療法を提供する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 a) APOE遺伝子のアレレに関してDNAを含有する生体試料を検定すること、および

b) タンパク質Lp(a)または糖タンパク質アポ(a)の血漿量を検定すること、

を含むアルツハイマー病を有する患者の、またはADを発症する被験者の危険度の増大を予知する方法であって、

前記APOE遺伝子の4アレレの存在およびLp(a)/アポ(a)の血漿量の増加により患者がアルツハイマー病を有するまたはADを発症する危険度の増大を表示する、方法。

【請求項2】 Lp(a)/アポ(a)の量を、免疫検定法すなわち免疫酵素検定法を使って検定する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 第一抗体がK4-1および2型の反復に対抗するように働き(Lp(a)を捕捉するために)、またそれによって形成される免疫複合体の検出を行なうためにセイヨウワサビのペルオキシダーゼと接合した第二抗体がK4-9型の反復に対抗するように向けられるサンドウィッチELISA法を使ってLp(a)/アポ(a)量を検定する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 i) 患者または被験者由来の、少なくともAPOE遺伝子またはその部分を増幅する第一のプライマー対と組み合わさったDNAの生体試料中のDNAを増幅すること、および

ii) ステップi)の増幅産物を可視化し、それによってAPOE4アレレの存在を検定すること、

を含む、請求項1～3に記載の方法。

【請求項5】 APOE遺伝子の少なくとも一部を増幅することが可能な第一のプライマー対と、

DNA試料中のAPOE4アレレの存在を検定するための試薬と、

Lp(a)/アポ(a)を認識する少なくとも1種類の抗体、とを含むキット。

【請求項6】 前記試薬がAPOE4に特異的なプローブである、請求項5に

記載のキット。

【請求項7】 さらにDNAを増幅するための少なくとも1種類の試薬を含む、請求項5または6に記載のキット。

【請求項8】 さらにポリアクリルアミドゲルの電気泳動を行なうための試薬を含む、請求項5～7のいずれか一項に記載のキット。

【請求項9】 前記抗体が酵素すなわちセイヨウワサビのペルオキシダーゼと接合している、請求項5に記載のキット。

【請求項10】 少なくとも1種類のAPO 4アレルを保有する被験者のアルツハイマー病の予防または治療用薬物の製造のためにLp(a)の血漿量を低下させることが可能な化合物を使用すること。

【請求項11】 前記化合物がアポ(a)遺伝子の転写を改良する、すなわちダナゾールまたはレチノイン酸からなる、請求項10に記載の化合物の使用。

【請求項12】 前記化合物がアポ(a)遺伝子の発現を改良する、すなわちオリゴヌクレオチドリボザイムからなる、請求項10に記載の化合物の使用。

【請求項13】 前記化合物がアポ(a)/Lp(a)タンパク質の産生を阻害する、請求項10に記載の化合物の使用。

【請求項14】 前記化合物がアポ(a)タンパク質の折りたたみを改良する、すなわちジスルフィド架橋の形成を阻害する抗酸化物質からなる、請求項13に記載の化合物の使用。

【請求項15】 前記化合物がアポ(a)タンパク質のグリコシル化を改良する、すなわちカタノスペルミンからなる、請求項13に記載の化合物の使用。

【請求項16】 前記化合物がアポ(a)タンパク質と細胞表面の結合を改良する、すなわちデオキシストレプトタミン科の抗生物質からなる、請求項13に記載の化合物の使用。

【請求項17】 前記化合物がアポ(a)とアポB100タンパク質の結合を改良する、すなわちリジン、アルギニン、またはフェニルアラニンの類似体、または抗アポ(a)抗体からなる、請求項13に記載の化合物の使用。

【請求項18】 少なくとも1種類のAPO 4アレルを保有する被験者のアルツハイマー病の予防または治療用薬物の製造のための、アポ(a)/Lp(a)

とその受容体の結合を阻害することが可能な化合物の使用。

【請求項19】 アポ(a) / Lp(a) とその受容体の結合を阻害する前記化合物が、アポ(a) K4 - 6 ~ 7型の部位とコレステロールによって引き起こされる受容体との結合を妨げる化合物である、請求項18に記載の化合物の使用。

【請求項20】 アポ(a) / Lp(a) とその受容体の結合を阻害する前記化合物が、LRP (低密度リポタンパク質の受容体関連のタンパク質) と相互に作用する化合物すなわち - 2 マクログロブリンまたは表面プロテオグリカンからなる、請求項17に記載の化合物の使用。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、アルツハイマー病（AD）の診断または予知のための方法に関する

。

**【0002】**

本発明はさらに、ADを予防または治療するための療法を提供する。

**【0003】**

アルツハイマー病は、アミロイドのプラーク、神経原線維変化、また多くの場合アミロイドの血管障害に関連する大脳皮質性ニューロンの損失を伴う早期痴呆を特徴とする脳の病理学である。アルツハイマー病の病因中に遺伝的影響があるのではないかということが強く疑われている（国際公開第94/01772号）。

**【0004】**

この遺伝的構成要素は、この病に罹る個体間の家族的関連を説明するためにこの病が年齢依存型の表現率を伴う常染色体優勢な形で遺伝することを示唆する間接的な観察によって長年の間に前面に出てきた。最近の分子遺伝学的研究は、染色体特異的な多形性遺伝的標識を探ることによってアルツハイマー病の推定される遺伝子を単離することを可能にした（Bird等の論文、Neurobiology of Aging 10,432-434（1989））。

**【0005】**

3つの染色体すなわち21番染色体、14番染色体、および19番染色体の局在化が、早期に兆候の現れる家族に特有の形態（兆候の現れる年齢が60才未満）に関係しているとして記述されている。2つの関連のある研究は、染色体領域19q13.2が、晩年にアルツハイマー病の兆候の現れる家族に特有の形態と関連していることを示唆している（Pericak-Vance等の論文、Am. J. Hum. Genet. 48, 1034-1050（1991）およびSchellenberg等の論文、Ann. Neurol. 31, 223-227（1992））。この染色体領域内ではアポリポタンパク質（APO）E-CI-CI -CIIに対する遺伝子群が候補帯である。これら遺伝子の産物の中でアポリポタンパク質E（APOE）は特に神経系の中に含まれる。APOEは老化したプラーク中に存在し、ペプチド - A4に対する結合親和性を有する。Strittmatter等の論文（Proc. Natl

. Acad. Sci. 90,177-181 (1993) ) には、晩年にアルツハイマー病の兆候の現れる家族に特有の形態におけるAPOE遺伝子の 4アレル (対立遺伝子) の頻度の増加について記述されている。この観察は、アルツハイマー病の家族に特有の形態 (Corder等の論文、Science 261,921-923 (1993) ) および散发性の形態 (Corder等の論文、Science 261,921-923 (1993) およびSaundersらの論文、Neurobiology 13,1467-1472 (1993) ) について確かめられた。

【0006】

その上、Schellenberg等の論文 (Ann. Neurol. 31: 223-227 (1992) ) には、アポリポタンパク質CII遺伝子のFアレル (TaqI制限断片長多型 (RFLP) アレル) とアルツハイマー病の家族に特有の形態との間の遺伝的関連について報告されている。

【0007】

さらに本発明者等は、被験者がADを発症する危険度がAPOE 4アレルに加えてAPO CIIアレルまたは / および短いD19S178アレルの存在と関係していることをすでに国際公開第95/24504号において報告している。

【0008】

本発明の著者等はさらに、アルツハイマー病発症の危険度は、APOE遺伝子のプロモーター中にAPOEタンパク質の発現の変態につながるT Gの突然変異が存在する場合に増加することを実証した。

【0009】

さらにAPO 4アレルは、AD患者における冠状動脈のアテローム性動脈硬化症と関連している (O.Kosunen等の論文、Stoke, vol. 26, n°5 (1995) ) 。

【0010】

こうして研究の結果、本発明の発明者等はアポ (a) がアルツハイマー病の危険因子であるという発見に至った。

【0011】

ヒトのLp (a) は、低密度のリポタンパク質 (LDL) 粒子と、アポリポタンパク質 (a) [アポ (a) ] と称される炭水化物を多く含む高度の疎水性のタンパク質との集合によって形成されるリポタンパク質粒子である。Lp (a)

中ではアポ(a)の1個の分子がジスルフィド架橋によりアポB100成分と共役結合しており、アポ(a)の存在がLp(a)を全ての他のリポタンパク質の種と区別している。

#### 【0012】

タンパク質の質量の約30%を構成する高い炭水化物含量に加えてアポ(a)はまた、大きさおよび構造がかなり不均一である。アポ(a)は、その各々がプラスミノゲンと高度の相同性を示す3つの異質な構造ドメインによって形成される。プラスミノゲンは、プロテアーゼドメインによって、またクリングルと呼ばれる5つのドメインすなわち指定されたクリングル1~5によって形成される。各クリングルは6個の保存システイン残基を含有し、これらがクリングルに特有の三重ループ構造をもたらす3つのジスルフィド結合を形成する。アポ(a)は、不活性なプロテアーゼのドメインおよびクリングル5ドメインの1つのコピー(この両者はプラスミノゲンの対応するドメインと~85%の相同性を示す)と、プラスミノゲンに似たクリングル4(K4)ドメインの複数のコピーとを含有する。アポ(a)K4の複数のコピーはお互いに似ているが同一ではなく10種類の異質なクリングル型(K4-1~10型)に分けることができ、それらのプラスミノゲンのK4との相同性は78%から88%の範囲にある。アポ(a)粒子当たりK4-1型および3~10型の各々に1つのコピーが存在するが、K4-2型には不定回数の反復(3~>40)が存在し、したがってアポ(a)の、またその結果Lp(a)の大きさの不均一性の原因である。

#### 【0013】

次に本発明の発明者等は、APOEと同一の受容体と結合するLp(a)の血漿量の増加がADと関連があるかどうかを試験し、血漿Lp(a)量の増加がAPOE4保有者中でADの発症の付加的危険因子を構成する可能性があることを見出した。

#### 【0014】

本発明者等が行なった調査の結果は、ADの診断法を改良するための、より正確にはADを発症する危険度の増大を予知するための、ならびにADと闘うために革新的な予防および治療戦略を立案するための基本原理を提供する。

## 【0015】

一態様において本発明は、

a) 患者または被検者のDNAを含有する生体試料をAPOE遺伝子のアレレについて検定すること、および

b) タンパク質Lp(a)または糖タンパク質アポ(a)の血漿量を検定すること、

を含むアルツハイマー病を有する患者の、またはADを発症する被検者の危険度の増大を予知する方法を提供し、APOE遺伝子の4アレレの存在およびLp(a)/アポ(a)量の増加によりアルツハイマー病を有するまたはADを発症する患者の危険度の増大を表示する。

## 【0016】

本発明の意味する「Lp(a)/アポ(a)量の増加」とは、アポ(a)量が健康な被検者の同一年齢集団に対して少なくとも8.6mg/dl増加することを意味する。

## 【0017】

タンパク質の血漿量についてはどの測定方法も適している。

## 【0018】

好ましい実施形態には、放射線免疫検定法(RIA)、酵素結合免疫検定法(ELISA)、免疫放射線検定法(IRMA)、免疫酵素検定法(IEMA)、蛍光免疫検定法(FIA)、化学発光免疫検定、免疫凝集検定(IA)などがある。

## 【0019】

免疫検定は、単クローン抗体および/または多クローン抗体を用いるサンドウィッチ検定法を含む様々な種類のものであってもよい。

## 【0020】

免疫検定は、当技術分野で知られている1ステップ、2ステップ、または3ステップで行なうことができる。

## 【0021】

判定は、液相中または固体担体上で行なうことができる。

## 【0022】

Lp(a)/アポ(a)を認識する抗体は、Lp(a)/アポ(a)に対して高度に特異的であらねばならない。

## 【0023】

好ましい実施形態において本発明の方法は、第一抗体がK4-1および2型の反復に対抗するように働き(Lp(a)を捕捉するために)、またそれによって形成される免疫複合体の検出を行なうためにセイヨウワサビのペルオキシダーゼと接合した第二抗体がK4-9型の反復に対抗するように向けられるサンドウィッチELISA法を使ってLp(a)/アポ(a)の血漿量を判定することからなる。

## 【0024】

APOEの多型現象の判定は、当技術分野でよく知られている任意の方法により行なわれる。

## 【0025】

一実施形態においてこの方法は、

i) 少なくともAPOE遺伝子またはその部分を増幅する第一のプライマー対で、患者または被検者由来のDNAを含有する生体試料中のDNAを増幅し、

ii) ステップ1の増幅生成物を可視化すること、およびそれによってAPOEの4アレレの存在を決定することを含む。

## 【0026】

「DNAを含有する生体試料」とは、これには限定されないが例えば、血漿；血清髄液；リンパ液；皮膚の外分泌物；呼吸、腸、および尿生殖路；涙；唾液；血球；腫瘍；器官；組織；およびインビトロ細胞培養成分を含む個体由来のポリヌクレオチド分析物を含有することが疑われる組織または液体の試料を意味する。

## 【0027】

ステップi) は、核酸増幅法を本質的に含むことが知られている方法により増幅すべき核酸配列に隣接する領域と特異的に雑種形成するプライマー対を使って行なわれる。

## 【0028】

この方法は、好ましくはDNA増幅法すなわちPCRである（Innis等の著書、「PCR protocols : A guide to Methods and Applications」(Academic Press, San Diego, California, 1990)）。

## 【0029】

好適なプライマーについては当技術分野に記述があり、すなわちHixson等の論文、J. Lipid Res. 31,545-548 (1990) に記載のものが含まれる。PCRを行なうための試薬および装置は市販されている。

## 【0030】

別の好適な方法もよく知られており、当業界で広く行なわれている（例えば、米国特許第4,683,195号および第4,683,202号、ならびにWu等の論文、Genomics 4, 560-569 (1989)を参照されたい）。

## 【0031】

ステップii) は、緊縮型雑種形成および洗浄条件下で標的配列のそれと安定な雑種を形成するポリヌクレオチドプローブを用いて、増幅した生成物の雑種形成を検出することによって行なわれる。

## 【0032】

APOE 4用プローブはAPOE 4アレレ領域および前記領域の全範囲または一部から誘導され、APOE 4領域に特異的な雑種形成を可能にする。

## 【0033】

プローブの長さは、少なくともヌクレオチド30個が有利である。

## 【0034】

プローブには、標識またはリポーター分子に付着した単離されたポリヌクレオチドがある。

## 【0035】

更なる態様によれば本発明は、  
少なくともAPOE遺伝子の一部を増幅することが可能な第一のプライマー対と、  
DNA試料中のAPOE 4アレレの存在を検定するための試薬と、  
Lp(a) / アポ(a) を認識する少なくとも1種類の抗体

とを含む、ADを有する患者の、またはADを発症する被験者の危険度の増大を予知するためのキットを提供する。

【0036】

試薬は有利には、APOE 4に特異的なプローブである。

【0037】

キットはまた、DNAを増幅するための少なくとも1種類の試薬を含む。試薬は有利には、ポリメラーゼの連鎖反応を行なうことができるポリメラーゼ酵素である。一例はTaqポリメラーゼである。

【0038】

本発明のキットはまた、ポリアクリルアミドゲルの電気泳動を行なうための試薬を備える。

【0039】

好ましい実施形態において抗体は、酵素すなわちセイヨウワサビのペルオキシダーゼと接合した単クローン抗体である。

【0040】

本発明はさらに、アルツハイマー病を予防または治療するための療法を提供する。

【0041】

したがって別の態様において本発明は、少なくとも1種類のAPO 4アレルを保有する被検者におけるアルツハイマー病の予防または治療用の薬物の製造のためにLp(a)の血漿量を低下させることが可能な化合物の使用法を提供する。

【0042】

第一の実施形態において化合物は、アポ(a)遺伝子の転写の修飾因子である。

【0043】

好ましい例は、レチノイン酸(Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 238 (1): 48~52 (1997, Sept.))およびダナゾール(Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 227 (2): 570-5 (1996, Oct.))である。

【0044】

第二の実施形態において化合物は、アポ ( a ) 遺伝子の発現の修飾因子である

。

【 0 0 4 5 】

この化合物は、一般にはオリゴヌクレオチドリボザイム (Circulation 3 (18)  
: 1898-909 (1998, Nov.)) である。

【 0 0 4 6 】

これらの化合物は、アポ ( a ) の合成を改変、好ましくは低下させる。

【 0 0 4 7 】

第三の実施形態において化合物は、アポ ( a ) タンパク質の折りたたみを改良  
する。

【 0 0 4 8 】

この化合物は一般に、ジスルフィド架橋の形成を阻止することができる化合物  
すなわち抗酸化物質である。

【 0 0 4 9 】

第四の実施形態において化合物は、アポ ( a ) タンパク質のグリコシル化を改  
良する。

【 0 0 5 0 】

この型の一例はカタノスペルミン (J. Bio/Chem. 21,272 (8): 5078-55 (1997  
Feb.)) である。

【 0 0 5 1 】

第五の実施形態において化合物は、アポ ( a ) タンパク質と細胞表面の結合を  
改良する。

【 0 0 5 2 】

この化合物は一般には抗生物質すなわちネオマイシンなどのデオキシストレブ  
タミン科の抗生物質である (J. Lipid. Res. 37 (10): 2055-64 (1996 Oct.))

。

【 0 0 5 3 】

第六の実施形態において化合物は、アポ ( a ) とアポ B100タンパク質の結合  
を改良する。

## 【0054】

この化合物は、リシン（例えば アミノカプロン酸（Arterioscler Thromb. V asc. Biol. 18 (11): 1738-44 (1998 Nov.)））、アルギニン、またはフェニルアラニン（Biochemistry 26, 37 (21); 7892-8 (1998 May)）の類似体、または抗アポ（a）抗体からなってもよい。

## 【0055】

別法では、化合物はアポ（a）を認識する抗体からなってもよい（J. Biol. Chem. 18, 269 (46): 28716-23 (1994 Nov)）。

## 【0056】

第三、四、五、および六の実施形態による化合物は、アポ（a）/Lp（a）の産生の低下をもたらす。

## 【0057】

更なる態様において本発明は、少なくとも1種類のAPO 4アレルを保有する被検者におけるアルツハイマー病の予防または治療用の薬物の製造のために、アポ（a）/Lp（a）とその受容体の結合を阻害する化合物の使用法を提供する。

## 【0058】

第一の実施形態において化合物は、アポ（a）K4-6~7型とコレステロールによって作動する受容体との結合部位を塞ぐものである（J. Biol. Chem. 13, 271 (50): 32096-104 (1996 Dec.)）。

## 【0059】

第二の実施形態において化合物は一種のLPR（低密度リポタンパク質の受容体関連タンパク質）である。

## 【0060】

一般に化合物は、2マクログロブリンまたは表面プロテオグリカン、すなわちヘパリナーゼ、コンドロイチナーゼABC、または塩素酸ナトリウムからなる（FASEB J. 12 (15): 1765-76 (1998 Dec.)）。

## 【0061】

下記の非限定的な実施例および添付図面は本発明を例示するものである。

## 【0062】

## 方法：

### 臨床試験

研究の協力者はカフカス地方生まれで、欧州で募集された。彼らは臨床的に入念に調査された。ADの診断がDSM-III-R基準 (American Psychiatric Association, 1987) およびNINCDS-ADRDA (Mc Kahn等の論文、Neurol. 34: 939-944 (1984)) に対して行なわれ、被検者は痴呆に関して何のDSM-III-R条件も存在せず、認識機能が完全に保存された状態で存在する非痴呆の対照として類別された。対照の募集は1993年2月から8月の間に行なわれたのに対し、ADを有する被検者は1994年5月から1995年6月の間に募集された。女性協力者は全て閉経期後であった。各協力者に対して合計20mlの血液をEDTA上で採集し氷上で保管し、4時間以内に遠心分離にかけた。血漿を単離し、分割量を-80で保管した。

### 【0063】

### 実験法

ELISA検定に用いるまでは決して解凍しなかった試料のLp(a)の血漿レベルを定量した (Marcovina等の論文、Clin. Chem. 41/2:246-255 (1995))。この方法は、捕捉抗体としてIgG-a6、また検出される抗体としてセイヨウワサビのペルオキシダーゼと接合したIgG-a40を利用する。IgG-a6はアポ(a)K4-1および2型の反復を認識する。アポ(a)イソ型のサイズを決定するために、血漿タンパク質を2%SDS-アガロースゲル上でサイズ分画し、それらの泳動に基づいて十分特徴を調べられている標準に対する相対的なアポ(a)イソ型のサイズを決定した (Mooser等の論文、Am. J. Hum. Gen. 61:402-417 (1997))。加えて本発明者等は、アポ(a)遺伝子の5'フランキング領域中の(TTTTA)<sub>n</sub>ペンタヌクレオチド反復の多型現象の特徴を調べ (Mooser等の論文、Human Mol. Gen. 4:173-181 (1995))、APOEの遺伝子型決定を行なった (Hixson等の論文、J. Lipid. 31: 545-548 (1990))。

### 【0064】

### ヒトの脳中のアポ(a)の免疫組織化学的分析

15の死体解剖例のすべてが試験された。脳を10%ホルマリン中で4週間固

定し、 $\sim 3 \times 2 \times 1$ cmのブロックを前頭部と頭頂部の連合野（それぞれプロドマン領8～9および39～40）および側頭領域から摘出した。側頭領域には海馬および内鼻皮質が含まれる。ブロックをパラフィン中に埋め込み、 $5 \mu\text{m}$ の薄片を組織的および免疫組織化学的分析に用いた。老化したプラークはチオフラビンS法を用いて染色し、アミロイド（DAKO, Zug, Switzerland）に対して向けられる単クローン抗体（M872）を用いた免疫組織化学によって試験され、一方神経原線維変化はGallyasの銀手法を用いて染色した。試験された死体解剖15例の中で10例はKhachaturian（Arch. Neurol. 42:1097-1105（1985））によって提案されたADの神経病理学的診断用の定量的な組織学的基準を満たしたのに対し、残りの5例には何のAD型の大脳皮質の変化も検出されなかった。アポ（a）の免疫検出に関しては、内因性のペルオキシダーゼ活性を取り除くために薄片を脱パラフィン化し、再水和し、0.3%メタノール性過酸化剤で30分間処理した。次いで薄片を希釈した正常なウサギの血清（1:100）により37℃で30分間処理し、IgG-a5（ $50 \mu\text{g/ml}$ に希釈したもの）またはIgG-a40（ $10 \mu\text{g/ml}$ に希釈したもの）と共に4℃で夜通しインキュベートした。検出は硫酸アンモニウムニッケル法または製造業者（DAKO）の助言に従ってABCキットを用いて行ない、続いてヘマトキシリンで対比染色を行なった。対照用薄片は、一次抗体の除外後または関連性のない単クローン抗体と共にインキュベートした後に試験された。

#### 【0065】

##### 統計解析

統計解析はSASソフトウェアリリース6.10（SAS Institute Inc, Cary, NC）により行なった。平均値および標準偏差（SD）を量的変数について計算した。必要な場合はピアソンの $\chi^2$ またはフィッシャーの直接法を用いて分類別データを検定した。多変量ロジスティック回帰モデルを用いて調整されたORおよび95%CIを推定した。考慮に入れた共変量は年齢と性別である。

#### 【0066】

##### 結果：

リポタンパク質（a）〔Lp（a）〕のレベルは、非痴呆の対照の個体296名と、年齢65才以上で痴呆と診断された被検者（晩年に兆候の現れたAD）200

名(70.2%)を含むアルツハイマー病の被検者285名から採集した血漿試料で定量した。

#### 【0067】

協力者を少なくとも1種類のAPOE 4アレレの存在に従って区分し、それらの特徴を下記の表に記載した。予想した通り痴呆の被検者(170/285、60%)中のAPOE 4アレレ保有者の割合は、対照群(74/296、25%; 罹病確率(OR)4.4、95%信頼区間(CI)3.1-6.4;  $p < 0.00001$ )よりも高かった。4つの群において男性の割合は女性よりも低かった。痴呆の被検者は対照よりも高齢であった。しかしながら、対照またはADの被検者において年齢はAPOE 4保有者およびAPOE 4非保有者に関して同様であった。

#### 【0068】

予想した通り4つの群において血漿Lp(a)量の分布は低い値の方へ著しく偏っているのに、対数変換した値は正規分布に近かった。

#### 【0069】

APOE 4保有者における痴呆の被験者の血漿Lp(a)量は対照の血漿Lp(a)量よりも高く(9.8mg/dl対6.9mg/dl(中央値)、 $p=0.049$ 、下記の表)、血漿Lp(a)量が $<10$ mg/dlの被検者の割合は対照より低かった(51%対66%、 $p=0.03$ )。APOE 4保有者の痴呆と非痴呆の間の血漿Lp(a)量の分布の違いは、冠状動脈疾患の有無の被検者に関して報告されているものと非常によく似ている(Sandholzer等の論文、Arterioscl. Thromb. Vas. Biol. 12:1214-1216 (1992))。これに対して、APOE 4非保有者においては血漿Lp(a)量の中央値は痴呆の有無の被検者に関して同様であった(8.6mg/dl対8.5mg/dl、 $p=0.82$ )。この観察の結果は、痴呆と非痴呆のAPOE 4保有者の間の血漿Lp(a)量の分布の違いが痴呆自体によるものでなく、またこれら2つの群の間の年齢の違いによるものでもないことを示唆している。

#### 【0070】

Lp(a)と、またリガンド(VLDL-R(Argaves等の論文、J. Clin. Invest. 100: 2170-2181 (1997))、LRP(Marz等の論文、FEBS 325: 271-275 (1993))、およびGP330/メガリン(Niemeier等の論文、Arterioscler Thromb. Vas. Bio

1. (1998) およびLa Ferla等の論文、J. clin. Invest. 100: 310-320 (1997) としてのAPOEを有する受容体との結合は、アポリポタンパク質(a) (アポ(a) (Marz等の論文、同上))、すなわちLDLのアポリポタンパク質Bに共有結合で付着してLp(a)を形成する特有かつ高度に多型の糖タンパク質(Utermann等の論文、Science 246: 904-910 (1989))のサイズに左右される。アポ(a) イソ型のサイズはアポ(a) 遺伝子内のK4のコピーの数によって規定される。この問題に取り組むために、本発明者等は被検者の4つの群中のアポ(a) イソ型のサイズを試験した。全体としては免疫ブロット分析によって検出可能なアポ(a) イソ型を保有しない被検者の割合は10% (57/581)であった。検出可能なバンドを1本だけ有する被検者に対するアポ(a) イソ型、または検出可能なバンドを2本有する被検者に対するもっと小さなアポ(a) イソ型のサイズの度数分布は、4つの群の間で同様であった(下記の表)。予想した通りアポ(a) イソ型のサイズと血漿Lp(a)の間には逆の関係が見られ、この関係は調査した4つの群に関して同様であった。

#### 【0071】

次に、本発明者等はアポ(a) 遺伝子の5 フランキング領域中に位置した(TTTTA)<sub>5-12</sub>多型現象の特徴を調べた。この多型現象は、Lp(a)の血漿量に影響を及ぼすアポ(a) 遺伝子のサイズおよび配列により強い連鎖不平衡状態にある。別の集団で観察されるように最も多いアレレは、TTTTA反復が8コピー(69.3%)であるのに対し、10コピー(14.9%)、9コピー(13.9%)、11コピー(1.6%)を含有するアレレは少ない。この集団ではTTTTA反復の5, 6, 7、または12コピーを含有するアレレの頻度は0.5%未満であった。4つの群の間ではTTTAアレレの分布に顕著な違いは観察されなかった。これらの分析をすべて合わせると、ADとアポ(a)の間の関連が、アポ(a) 遺伝子におけるアポ(a) イソ型または特異的アレレのサブセットに限定されないことを示している。

#### 【0072】

Lp(a)の血漿が高レベルで存在する場合にADを有する危険度を決定するために、本発明者等は多変量ロジスティック回帰分析を行なった。群全体に対する血漿Lp(a)量の中央値である8.6mg/dlを閾値に選んだ。APOE 4非保有者

では調査された年齢にわたってORの変化は何も観察されなかった(図1)。これに対してAPOE 4保有者では血漿Lp(a)量の $>8.6\text{mg/dl}$ の存在がADの危険度の漸進的増加と関連しており、 $>65$ 才の被験者( $n = \text{対照}68\text{人}$ およびAD被験者 $143\text{人}$ )における $1.2$ (95%信頼区間 $0.7\sim 2.1$ )から、 $>70$ 才の被験者( $n = 59\text{人}$ および $94\text{人}$ )に対する $2.1$ ( $1.1\sim 4.1$ )、 $>75$ 才の被験者( $n = 48\text{人}$ および $42\text{人}$ )に対する $5.1$ ( $1.9\sim 13.8$ )、および $>80$ 才の被験者( $n = 30\text{人}$ および $9\text{人}$ )に対する $15.2$ ( $1.7\sim 13.5$ )まで上昇した。同様の結果は、早期に兆候を示した被験者を分析から除外した場合にも、または血漿Lp(a)量に別の閾値を選んだ場合にも得られた。

### 【0073】

Lp(a)は、ハリネズミ、大型類人猿類、およびヒトを含む限られた数の種由来の血漿中で同定されている。血漿中を循環するアポ(a)は肝臓中で合成される。加えてアポ(a)転写物は、サルの精巣および脳中で同定され、また、より少ない程度では肺および副腎中で同定されている。しかしながらアポ(a)糖タンパク質がヒトまたはサルの脳中に存在するかどうかは知られていない。Lp(a)とADの間の関連に形態的根拠があるかどうかを調べるために本発明者等は、病理学的に判明したAD型の大脳皮質の変化を伴う10人のヒトの脳、およびADの徴候のない5人のヒトの脳について免疫組織化学的分析を行なった。それぞれN末端(K4-2型)およびC末端(K4-9型)に対して向けられ、プラスミノゲンと交差反応しないマウスの単クローン抗体IgG-a5およびIgG-a40を用いてアポ(a)を免疫検出した。両抗体は同一のパターンを示し、かつ一次抗体が除かれたまたは関連性のない抗体が用いられた対照の薄片においては何のシグナルも検出されなかったため、そのシグナルは特異的であった。すべてのAD例において、老化したプラーク(図2、パネルA)中に、神経原線維変化および顆粒空胞変性を伴うニューロンのサブセット中に、また反応性ミクログリアおよび星状膠細胞(パネルBおよびC)中にアポ(a)の免疫反応性が検出された。小さな比率の明らかに変化していないニューロンもまた染色された(パネルC)。加えて強いアポ(a)の免疫反応性が、軟膜の血管および実質血管の内皮細胞中に検出された。AD型の大脳皮質変化のない患者由来の脳で内皮細胞上に強

いアポ(a)の免疫反応性が見られたのに対し、わずかなニューロンのみがアポ(a)免疫陽性を示した。これらのニューロンには組織的に検出可能な変化がなかった。これらの分析は、アポ(a)がAD中に存在するニューロンの変質に関係している可能性があることを示唆した。

【0074】

APOE 4に特異的な高い血漿Lp(a)量とADの間の関連を説明するために様々なシナリオを提案することができる。APOE 4の保有者は、外傷または卒中などの脳の発作後にADを発症する危険度がより高い。一方、高い血漿Lp(a)量は脳梗塞と関連性がある。APOE 4の非保有者ではこのような血管の損傷が機能上の結果を生じないかまたはわずかであると考えられる。これとは対照的にAPOE 4の保有者ではニューロンの可塑性および再生能力が限られているため、このような血管の損傷がADの発症に漸進的につながっていく可能性がある。このシナリオはそれ自体、ADの発生機序における血管因子の仮説を補強することになる。Lp(a) (またはAPOEを運ぶLp(a)粒子の分画)の結合が、ニューロンへのコレステロールの送達を増加させる一因である可能性があるということもまた考えられる。コレステロールは、その遮断がニューロンに対して有利に作用することがインビトロで示唆されているように毒性がある可能性がある。最後にアポ(a)は、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子またはトロンピンなどの他のクリングル含有タンパク質の邪魔をする可能性がある。

【0075】

以上のことをまとめると、このデータはAPOE 4が関連するADの発症において修飾因子の特性として影響を及ぼす高い血漿Lp(a)量と矛盾しない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、血漿Lp(a)量が $>8.6\text{mg/dl}$ で存在する場合の、APOE 4非保有者(破線)およびAPOE 4保有者(実線)における罹病確率(OR)とADを有する患者の兆候の現れる年齢との間の関係を示す。APOEはHixson等の論文、J. Lipid Res. 31:545-548に記載の遺伝子型であり、血漿Lp(a)レベルの定量化はELISA検定および明確な特異性をもつ単クローン抗体(Marcovina等の論文、C

lin. Chem. 41/2:246-255 (1995) ) を用いて行なった。罹病確率は、対数変換した血漿 Lp ( a ) 量に関する多変量ロジスティック回帰分析を用いて計算した。信頼区間は本文中に示す。

【図 2】

図 2 は、A D 型の大脳皮質の変化を伴うヒトの脳のアポ ( a ) の免疫検出において観察されるパターンを示す。下記に記載の方法により IgG-a5 抗体を用いて A D 型の大脳皮質の変化を伴う 2 人の被検者の脳についてアポ ( a ) が存在するかどうかを試験した。

【図1】

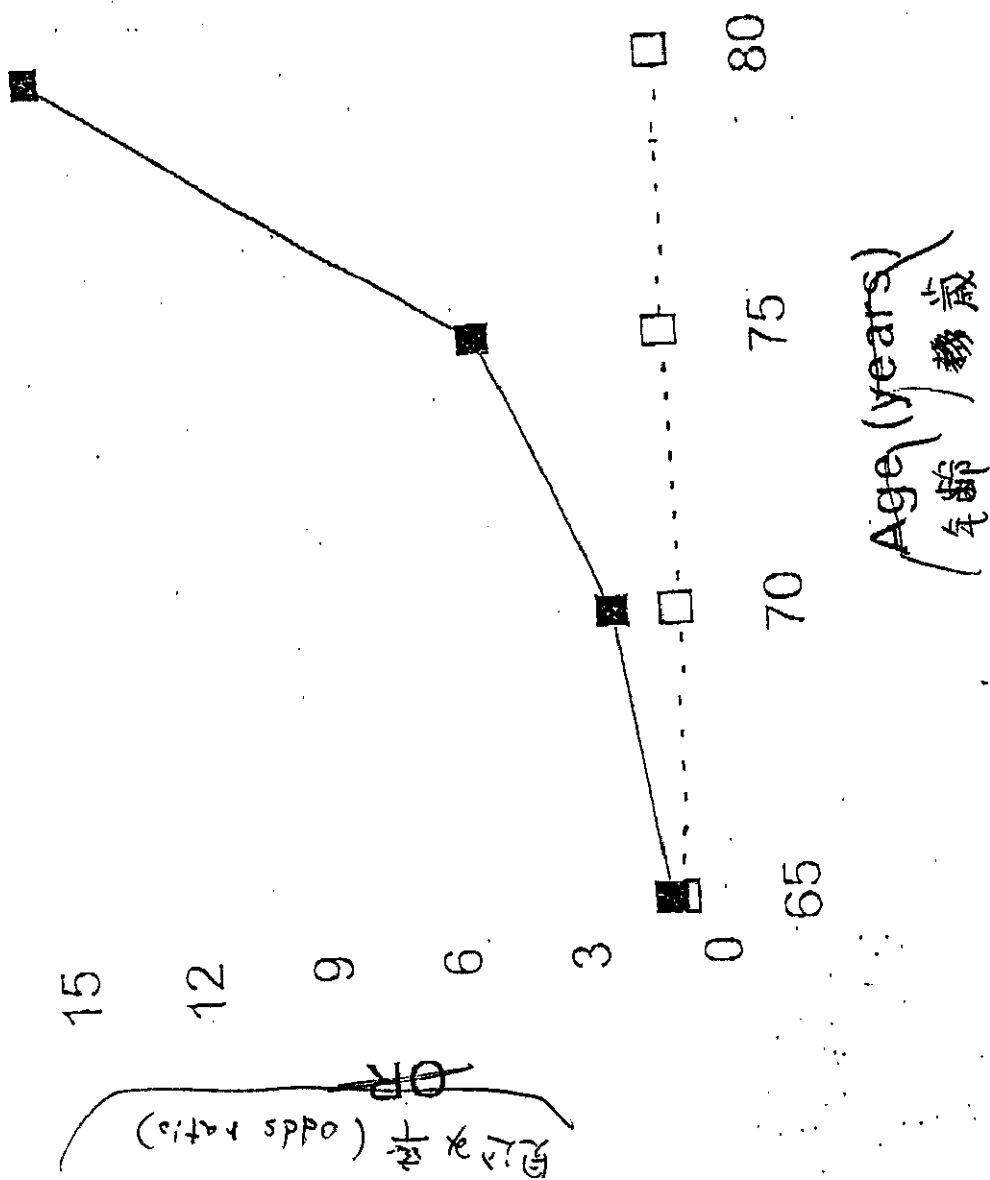


FIG.1

【图2】

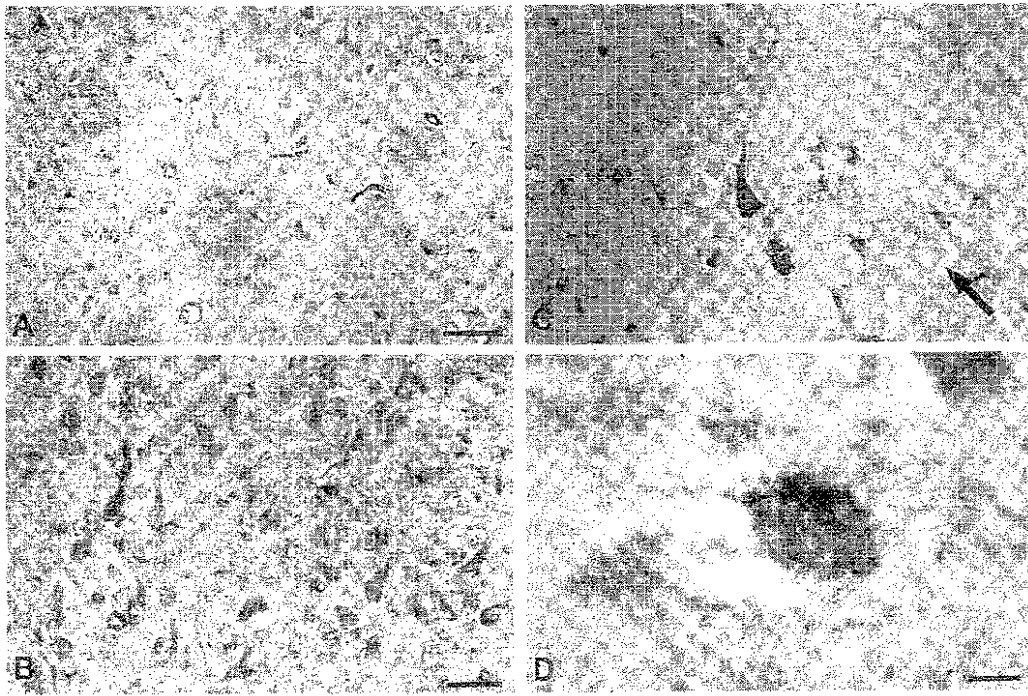


Fig. 2

【**手続補正書**】

【**提出日**】平成14年2月13日(2002.2.13)

【**手続補正2**】

【**補正対象書類名**】図面

【**補正対象項目名**】図1

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【図1】

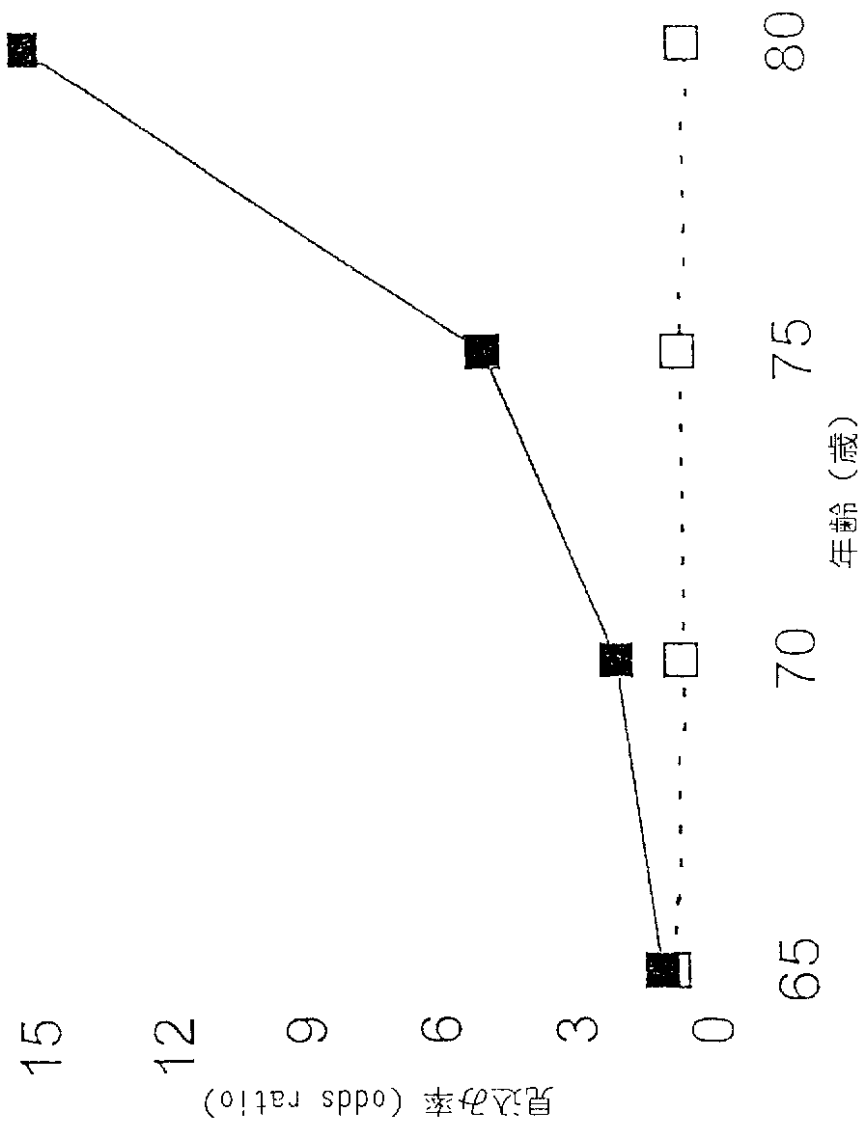


FIG.1

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 00/06730
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 B01N33/68 A61K38/46 A61K31/20 A61P25/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q A61K		
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) MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 24504 A (PASTEUR INSTITUT ; INST NAT SANTE RECH MED (FR); AMOUYEL PHILIPPE ()) 14 September 1995 (1995-09-14) cited in the application the whole document ---	1-9
A	KUO Y-M, ET AL.: "Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's Disease correlates with brain Abeta 1-42 levels" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 252, 1998, pages 711-715, XP002126049 the whole document --- -/-	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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 document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* 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 9 February 2001		Date of mailing of the international search report 15/02/2001
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 Osborne, H

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/06730

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KURIYAMA M ET AL: "Low levels of apolipoprotein A1 and AII in senile dementia" JAPANESE JOURNAL OF PSYCHIATRY AND NEUROLOGY, vol. 48, no. 3, - September 1994 (1994-09) pages 589-93, XPO00863586 see abstract	1
A	WO 98 18429 A (SCHERING AG) 7 May 1998 (1998-05-07) the whole document	10
A	WO 96 09392 A (RIBOZYME PHARM INC) 28 March 1996 (1996-03-28) the whole document	10, 12, 13

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06730

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9524504 A	14-09-1995	FR 2716894 A	08-09-1995
		AT 169343 T	15-08-1998
		CA 2184635 A	14-09-1995
		DE 69503885 D	10-09-1998
		DE 69503885 T	22-04-1999
		DK 749498 T	10-05-1999
		EP 0749498 A	27-12-1996
		JP 9511138 T	11-11-1997
		US 5942392 A	24-08-1999
		WO 9818429 A	07-05-1998
AU 4948497 A	22-05-1998		
BR 9712580 A	07-12-1999		
CN 1235548 A	17-11-1999		
CZ 9901500 A	17-11-1999		
EP 0941096 A	15-09-1999		
HU 9904498 A	28-05-2000		
NO 992061 A	29-04-1999		
PL 332956 A	25-10-1999		
WO 9609392 A	28-03-1996	US 5599706 A	04-02-1997
		AU 3720295 A	09-04-1996
		CA 2199727 A	28-03-1996
		EP 0782622 A	09-07-1997
		JP 10506016 T	16-06-1998
		US 5877022 A	02-03-1999

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 K	31/58	A 6 1 K	31/58	4 C 2 0 6
	31/7088		31/7088	
	38/00		39/395	D
	38/16		45/00	
	39/395	A 6 1 P	25/28	
	45/00	C 1 2 Q	1/02	
A 6 1 P	25/28		1/68	A
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/92	C
	1/68	A 6 1 K	37/04	
G 0 1 N	33/92		37/02	
(81)指定国	E P ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E ) , O A ( B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M ) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
(71)出願人	サントル オスピタリエ ユニベルシテー ル ボドワ ドゥ ローザンヌ スイス国, ツェーハー - 1011 ローザン ヌ, リュ ドゥ プニヨン, 9			
(71)出願人	アンスティテュ ナシオナル ドゥ ラ サントゥ エ ドゥ ラ ルシエルシェ メディカル (イーエヌエスエーエールエ ム) フランス国, エフ - 75013 パリ, リュ ドゥ トルピア, 101			
(72)発明者	モーゼ, バンサン スイス国, ツェーハー - 1011 ローザン ヌ, シュブ, リュ デュ プニヨン, 9			
(72)発明者	エルベク, ニコル フランス国, エフ - 59750 マルク アン バロール, リュ フェリックス フォー ル, 10			

(72)発明者 アモウエル, フィリップ  
フランス国, エフ - 59700 マルク アン  
パロール, リュ デュ ケスヌ, 75  
F ターム(参考) 2G045 AA01 CA26 DA62 DA66 DA67  
FA11 FB03  
4B063 QA07 QA19 QQ02 QQ42 QR62  
QS25 QS33  
4C084 AA02 AA17 BA44 DA38 ZA162  
4C085 AA13 BB11 DD88  
4C086 AA01 AA02 DA12 EA16 MA01  
MA04 ZA16  
4C206 AA01 AA02 DA12 FA01 FA53  
HA32 MA01 MA04 ZA16

专利名称(译)	诊断或预测阿尔茨海默氏病的方法和预防或治疗阿尔茨海默氏病的组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003504606A</a>	公开(公告)日	2003-02-04
申请号	JP2001509549	申请日	2000-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	裏爾巴斯德研究所 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所de l'Ile系列 中心Osupitarie Yuniberushiteru Bodowa洛桑 国立研究所德拉Santu等德拉Rusherushe医疗 ( E NS ER强麦EM )		
[标]发明人	モーゼバンサン エルベクニコル アモウエルフィリップ		
发明人	モーゼ,バンサン エルベク,ニコル アモウエル,フィリップ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/132 A61K31/198 A61K31/20 A61K31/203 A61K31/58 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 A61K38/55 A61K39/395 A61K45/00 A61P25/28 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/ /6883 G01N33/92		
CPC分类号	A61K31/20 A61K38/1709 A61K38/55 A61P25/28 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/172		
FI分类号	G01N33/53.W G01N33/53.V A61K31/132 A61K31/198 A61K31/203 A61K31/58 A61K31/7088 A61K39/ /395.D A61K45/00 A61P25/28 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/92.C A61K37/04 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/CA26 2G045/DA62 2G045/DA66 2G045/DA67 2G045/FA11 2G045/FB03 4B063/ /QA07 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DA38 4C084/ZA162 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/DD88 4C086/ /AA01 4C086/AA02 4C086/DA12 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/ZA16 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/DA12 4C206/FA01 4C206/FA53 4C206/HA32 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/ /ZA16		
优先权	1999401742 1999-07-09 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及预测患有阿尔茨海默氏病 ( AD ) 的患者或发展AD的受试者的风险增加的方法, 其中a) 对包含DNA的生物样品中的APOE基因的等位基因进行测定。 b) 测定蛋白Lp ( a ) 或糖蛋白载脂蛋白 ( a ) 的血浆体积, APOE基因的ε4等位基因的存在以及[Lp ( a ) ] / apo ( a ) 的血浆体积 该增加表示患有阿尔茨海默氏病或发展为AD的患者的风险增加。 本发明进一步提供了AD的预防或治疗, 其包括在携带至少一种APOEε4等位基因的患者中降低Lp ( a ) 的血浆体积或Lp ( a ) 与其受体的相互作用。 提供治疗。

