

(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2008-508893

(P2008-508893A)

(43) 公表日 平成20年3月27日(2008.3.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34 Z N A	2 G 0 4 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-525296 (P2007-525296)  
 (86) (22) 出願日 平成17年8月8日 (2005.8.8)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年4月4日 (2007.4.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/053896  
 (87) 国際公開番号 W02006/015976  
 (87) 国際公開日 平成18年2月16日 (2006.2.16)  
 (31) 優先権主張番号 60/600,379  
 (32) 優先日 平成16年8月11日 (2004.8.11)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506375738  
 エボテック・ニューロサイエンシーズ・ゲ  
 ー・エム・ペー・ハー  
 ドイツ国、22525・ハンブルク、シユ  
 ナツケンブルクアレー・114  
 (74) 代理人 100062007  
 弁理士 川口 義雄  
 (74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠  
 (74) 代理人 100140523  
 弁理士 渡邊 千尋  
 (74) 代理人 100119253  
 弁理士 金山 賢教  
 (74) 代理人 100103920  
 弁理士 大崎 勝真

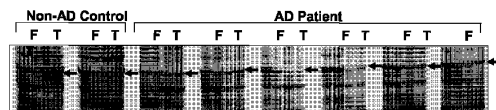
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質膜 ATPアーゼの診断及び治療への使用

(57) 【要約】

本発明は、ATP 2 B 遺伝子によってコードされた蛋白質を提供し、アルツハイマー病患者の特異的脳領域における ATP 2 B 蛋白質をコードする遺伝子の異なる発現を開示する。この発見に基づいて、本発明は、対象におけるアルツハイマー病を診断又は予測するための、又は対象がアルツハイマー病を発症する危険性が増加しているかどうかを測定するための方法を提供する。さらに、本発明は、ATP 2 B 遺伝子及びその対応する遺伝子産物を使用して、アルツハイマー病及び関連神経変性疾患を治療又は予防するための治療及び予防方法を提供する。神経変性疾患の調節剤をスクリーニングする方法も開示する。

Identification of differentially expressed genes in a fluorescence differential display screen



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象におけるアルツハイマー病を診断又は予測するか、或いは前記対象が前記疾患を発症する危険性が增大しているかどうかを測定するか、或いは前記疾患を有する対象に施す治療の効果をモニターする方法であって、

前記対象から得られた試料中における

( i ) 配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする遺伝子の転写産物、及び / 又は

( i i ) 配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする遺伝子の翻訳産物、及び / 又は

( i i i ) 前記転写産物又は翻訳産物の断片、又は誘導体、又は変種のレベル及び / 又は活性を測定すること、及び前記レベル及び / 又は前記活性を公知の疾患状態を表す参照値、及び / 又は公知の健康状態を表す参照値と比較すること、及び前記レベル及び / 又は前記活性が公知の健康状態を表す参照値と比較して変化しており、及び / 又は公知の疾患状態を表す参照値と同じか又は等しい場合、それによって前記対象におけるアルツハイマー病を診断又は予測すること、又は前記対象が前記疾患を発症する危険性が增大しているかどうかを決定することを含む、方法。

## 【請求項 2】

( i ) 配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする遺伝子の転写産物、及び / 又はその断片、誘導体、又は変種を検出する試薬、及び / 又は ( i i ) 配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする遺伝子の翻訳産物、及び / 又はその断片、誘導体、若しくは変種を検出する試薬からなる群から選択された少なくとも 1 種の試薬を含む、アルツハイマー病を診断若しくは予測するため、又は対象がこのような疾患を発症する素因を決定するため、又はアルツハイマー病を有する対象に施した治療の効果をモニターするためのキットの請求項 1 に記載の方法における使用。

## 【請求項 3】

配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする非天然遺伝子配列又はその断片、誘導体、又は変種を含む組換え非ヒト動物であって、前記動物は

( i ) 前記遺伝子配列及び選択可能なマーカー配列を含む遺伝子標的構築物を提供すること、及び

( i i ) 前記標的構築物を非ヒト動物の幹細胞に導入すること、及び

( i i i ) 前記非ヒト動物幹細胞を非ヒト胚に導入すること、及び

( i v ) 前記胚を偽妊娠非ヒト動物に移植すること、及び

( v ) 前記胚を出産予定日まで成長させること、及び

( v i ) ゲノムの両対立遺伝子に前記遺伝子配列の変更を含む遺伝子改変非ヒト動物を同定すること、及び

( v i i ) ゲノムが前記内在性遺伝子の変更を含む遺伝子改変非ヒト動物を得るために段階 ( v i ) の遺伝子改変非ヒト動物を飼育すること、この場合前記破壊が前記非ヒト動物に、徴候及び症状がアルツハイマー病に関連している神経変性疾患の徴候及び症状を発症する素因を示す結果をもたらす、  
によって得ることができる組換え非ヒト動物。

## 【請求項 4】

アルツハイマー病の治療に有用な診断薬及び治療薬の開発において、化合物、薬剤及び調節剤をスクリーニング、試験及び評価するための非ヒト試験動物及び / 又は対照動物としての請求項 3 に記載の組換え非ヒト動物の使用。

## 【請求項 5】

( i ) 配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする遺伝子、及び / 又は

( i i ) 配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする遺伝子の転写産物、及び / 又は

10

20

30

40

50

( i i i ) 配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする遺伝子の翻訳産物、及び / 又は

( i v ) ( i ) から ( i i i ) の断片、又は誘導体、又は変種からなる群から選択された 1 種以上の物質の発現又はレベル又は活性を改変する能力を有する、アルツハイマー病又は関連疾患の治療に使用するための薬剤、調節剤又は選択的アンタゴニスト又はアゴニストを同定するためのスクリーニング方法であって、前記方法が、

( a ) 試験化合物と細胞を接触させる段階と、

( b ) ( i ) から ( i v ) で列挙した 1 種以上の物質の活性及び / 又はレベル及び / 又は発現を測定する段階と、

( c ) 前記試験化合物と接触していない対照細胞において、( i ) から ( i v ) で列挙した 1 種以上の物質の活性及び / 又はレベル及び / 又は発現を測定する段階と、を含み、ならびに

段階 ( b ) 及び ( c ) の細胞における物質のレベル及び / 又は活性及び / 又は発現を比較する段階とを含み、この場合接触した細胞における物質の活性及び / 又はレベル及び / 又は発現の改変が、試験化合物がアルツハイマー病又は関連疾患の治療で使用するための薬剤、調節剤又は選択的アンタゴニスト又はアゴニストであることを示唆する、スクリーニング方法。

【請求項 6】

( i ) 配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする前記遺伝子、及び / 又は

( i i ) 配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする前記遺伝子の転写産物、及び / 又は

( i i i ) 配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする前記遺伝子の翻訳産物、及び / 又は

( i v ) ( i ) から ( i i i ) の断片、又は誘導体、又は変種からなる群から選択された 1 種以上の物質の発現又はレベル又は活性を改変する能力を有する、アルツハイマー病又は関連疾患の治療に使用するための薬剤、調節剤又は選択的アンタゴニスト又はアゴニストを同定するためのスクリーニング方法であって、前記方法が、

( a ) 神経変性疾患又は関連疾患若しくは障害の徴候を発症しやすい、又は既に発症している非ヒト試験動物に試験化合物を投与する段階と、

( b ) ( i ) から ( i v ) で列挙した 1 種以上の物質の活性及び / 又はレベル及び / 又は発現を測定する段階と、

( c ) 神経変性疾患又は関連疾患若しくは障害の徴候を発症しやすい、又は既に発症しており、このような試験化合物を投与されていない非ヒト対照動物において、( i ) から ( i v ) で列挙した 1 種以上の物質の活性及び / 又はレベル及び / 又は発現を測定する段階と、

( d ) 段階 ( b ) 及び ( c ) の動物における物質の活性及び / 又はレベル及び / 又は発現を比較する段階とを含み、この場合非ヒト試験動物における物質の活性及び / 又はレベル及び / 又は発現の改変が、試験化合物がアルツハイマー病又は関連疾患の治療で使用するための薬剤、調節剤又は選択的アンタゴニスト又はアゴニストであることを示唆する、スクリーニング方法。

【請求項 7】

前記非ヒト試験動物及び / 又は前記非ヒト対照動物が、天然の形質膜カルシウム A T P アーゼ遺伝子転写制御因子ではない転写制御因子の制御下で、配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼ又はその断片、又は誘導体、又は変種を発現する組換え動物である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼ、又はその断片、又は誘導体、又は

10

20

30

40

50

変種に対する前記化合物の前記結合を測定するために化合物を試験するための、好ましくは複数の化合物をスクリーニングするための方法であって、前記方法が

( i ) 前記形質膜カルシウム A T P アーゼ、又はそれらの断片、又は誘導体、又は変種の液体懸濁液を複数の容器に添加する段階と、

( i i ) 結合についてスクリーニングすべき、検出可能な、特に蛍光標識された化合物以上の検出可能な、特に蛍光標識された化合物類を前記複数の容器に添加する段階と、

( i i i ) 前記形質膜カルシウム A T P アーゼ、又はそれらの前記断片、又は誘導体又は変種を前記検出可能な、特に蛍光標識された化合物又は検出可能な、特に蛍光標識された化合物類と共にインキュベートする段階と、

( i v ) 前記形質膜カルシウム A T P アーゼ、又はそれらの前記断片、又は誘導体、又は変種に関連した好ましくは蛍光の量を測定する段階と、及び

( v ) 前記形質膜カルシウム A T P アーゼ、又はそれらの前記断片、又は誘導体、又は変種に対する 1 種以上の前記化合物による結合を測定する段階とを含む、方法。

【請求項 9】

アルツハイマー病を検出するための診断標的としての、形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする遺伝子の翻訳産物、又はその断片、又は誘導体、又は変種である、配列番号 1 の蛋白質分子の使用。

【請求項 10】

アルツハイマー病を予防、又は治療、又は改善するための試薬又は化合物のスクリーニング標的としての、形質膜カルシウム A T P アーゼをコードする遺伝子の翻訳産物、又はその断片、又は誘導体、又は変種である、配列番号 1 の蛋白質分子の使用。

【請求項 11】

対象から得られた試料における細胞の病理学的状態を検出するための、配列番号 1 を有する形質膜カルシウム A T P アーゼの蛋白質分子、又はその断片、又は誘導体、又は変種と特異的に免疫反応する抗体の使用であって、前記抗体による前記細胞の免疫細胞化学的染色を含み、この場合公知の健康状態を表す細胞と比較して、前記細胞における染色程度の変化、又は染色パターンの変化がアルツハイマー病に関連した前記細胞の病理学的状態を示す、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、対象における神経変性疾患の進行を診断、予測及びモニターする方法に関する。さらに、治療の管理方法及び神経変性疾患の調節剤のスクリーニング方法を提供する。本発明はまた、医薬組成物、キットの使用、組換え動物モデル及び前記組換え動物モデルの使用を開示する。

【背景技術】

【0002】

神経変性疾患、特にアルツハイマー病 ( A D ) は、患者の生命を非常に衰弱させる影響を与える。さらに、これらの疾患は、健康、社会及び経済に多大な負担を与える。A D は、最も一般的な神経変性疾患で、認知症全症例の約 70 % を占め、65 歳以上の人口の約 10 % 及び 85 歳以上の 45 % 近くに影響を及ぼす、年齢に関連したおそらく最も重篤な神経変性疾患である ( V i c k e r s 他、P r o g r e s s i n N e u r o b i o l o g y 2000、60 : 139 ~ 165 ; W a l s h 及び S e l k o e、N e u r o n 2004、44 : 181 ~ 193 )。現在、その症例の総数は、米国、ヨーロッパ及び日本で 1200 万と概算されている。この状況は、先進国における高齢者の人口増加に伴って益々悪くなるのは避けられないであろう。A D 患者の脳に生じる神経病理学的特徴は、アミロイド - 蛋白質からなる老人斑、及び異常な繊維構造の出現と共に生じる細胞骨格の著しい変化及び神経原線維濃縮体の形成である。

【0003】

アミロイド - 蛋白質は、様々な種類の蛋白質分解酵素によってアミロイド前駆蛋白質

10

20

30

40

50

(APP)が切断されることによって生じる (Selkoe及びKopan、Annu Rev Neurosci 2003、26:565~597; Ling他、Int J Biochem Cell Biol 2003、35:1505~1535)。AD患者の脳では、2種類の斑、びまん性老人斑及び神経突起斑を検出することができる。これらは主に大脳皮質及び海馬に見いだされる。脳内における毒性A沈着の生成は、AD経過の極早期に開始し、AD病変に至るその後の破壊的過程において重要な役割を担うと考えられている。ADのその他の病理学的特徴は、神経原線維濃縮体(NFT)及び異常神経突起で、神経網糸と呼ばれる (Braak及びBraak、J Neural Transm 1998、53:127~140)。NFTはニューロンの内側に出現し、化学的に変更したタウから構成され、互いの周りに巻き付いた対らせん線維を形成する。NFTの形成と並行して、ニューロンの損失を認めることができる (Johnson及びJenkins、J Alzheimers Dis 1996、1:38~58; Johnson及びHartigan、J Alzheimers Dis 1999、1:329~351)。神経原線維濃縮体の出現及びその数の増加は、ADの臨床的重症度とよく相関する (Schmitt他、Neurology 2000、55:370~376)。ADは、記憶形成の早期欠如に関連し、最終的には高度認知機能を完全に蝕む進行性の疾患である。認知障害には、とりわけ記憶障害、失語症、失認及び実行機能の欠如が含まれる。ADの病理発生の特徴は、変性過程に対する特定の脳領域及び神経細胞亜集団の選択的脆弱性である。具体的に、側頭葉領域及び海馬は、早期から影響を受け、疾患進行中により激しく影響を受ける。その一方で、前頭皮質、後頭皮質及び小脳内のニューロンはほとんどが完全なままであり、神経変性から保護される (Terry他、Annals of Neurology 1981、10:184~92)。

#### 【0004】

現在、ADの治療法はなく、ADの進行を止める効果的な治療法もなく、生前に高確率でADと診断する方法さえもない。個体がADを発症しやすくするいくつかの危険因子が同定されており、その中で最も際だっているのはアポリポ蛋白質E遺伝子(ApoE)の既存の3種の異なる対立遺伝子(イプシロン2、3及び4)のうちの対立遺伝子エプシロン4である (Strittmatter他、Proc Natl Acad Sci USA 1993、90:1977~81; Roses、Ann NY Acad Sci 1998、855:738~43)。染色体21上のアミロイド前駆体蛋白質(APP)、染色体14上のプレセニン-1及び染色体1上のプレセニン-2の遺伝子の遺伝的欠損が関与する早期発症型ADは希な例であるが、一般的な形態である晩期発症型孤発性ADの病因は今までのところわかっていない。神経変性疾患の晩期発症の複雑な病理発生は、治療薬及び診断薬の開発に大変な難題となっている。潜在的な薬剤標的及び診断マーカーの集団を拡張することが重要である。

#### 【発明の開示】

#### 【0005】

したがって、本発明の目的は、神経疾患の病理発生の見識を提供し、とりわけこれらの疾患の診断および治療法の開発に適した方法、材料、薬剤、組成物及び動物モデルを提供することである。この目的は、独立した請求項の特徴によって説明された。下位請求項は、本発明の好ましい実施形態を限定する。

#### 【0006】

本発明は、ヒトアルツハイマー病の脳試料における形質膜のカルシウムポンプ(形質膜 $Ca^{2+}$ -ATPアーゼ又はATP2B又はPMCA)をコードする遺伝子及びそれらの蛋白質の無調節な、差別的発現の検出に基づいている。

#### 【0007】

PMCAは、あらゆる真核細胞の細胞基質から $Ca^{2+}$ を排除する原因となる。これらは、 $Na^{+}/Ca^{2+}$ 交換体と共に、静止細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の長期調節に関与する主要な形質膜輸送系である。PMCAは、反応周期中にアスパルチルリン酸中間体が形成されることが特徴のP型の主要なイオン輸送性ATPアーゼファミリーに属する。哺乳類のP

10

20

30

40

50

M C A は、4 種類 の 別々 の 遺 伝 子 に よ っ て コ ー ド さ れ、他 の ア イ ソ フ ォ ー ム 変 種 は、主 要 な 遺 伝 子 転 写 物 の 選 択 的 R N A ス プ ラ イ シ ン グ に よ っ て 生 じ る。様 々 な P M C A ア イ ソ フ ォ ー ム 及 び ス プ ラ イ シ ン グ 変 種 の 発 現 は、発 生、組 織 及 び 細 胞 特 異 的 な 方 法 で 調 節 さ れ て お り、こ れ ら の ポ ン プ は、特 定 の 細 胞 及 び 組 織 の 生 理 学 的 必 要 性 に 機 能 的 に 適 合 し て い る こ と を 示 唆 し て い る。選 択 的 ス プ ラ イ シ ン グ は、形 質 膜  $C a^{2+}$  ポ ン プ 蛋 白 質 の 2 種 類 の 主 要 な 位 置、第 1 細 胞 内 ル ー プ 及 び C O O H 末 端 に 影 響 を 及 ぼ す。こ れ ら 2 種 類 の 領 域 は、ポ ン プ の 主 要 な 調 節 ド メ イ ン に 対 応 す る。第 1 細 胞 基 質 ル ー プ で は、影 響 を 受 け る 領 域 は 推 定 G 蛋 白 質 結 合 配 列 と リ ン 脂 質 感 受 性 部 位 の 間 に 入 り 込 ん で お り、C O O H 末 端 で は、ス プ ラ イ シ ン グ は、カ ル モ ジ ュ リ ン に よ る ポ ン プ 調 節、リ ン 酸 化、及 び P D Z ド メ イ ン 含 有 ア ン カ ー 蛋 白 質 及 び シ グ ナ ル 伝 達 蛋 白 質 と の 差 異 的 相 互 作 用 に 影 響 を 及 ぼ す。難 聴 及 び 運 動 失 調 な どの 疾 患 を 引 き 起 こ す P M C A 変 異 を 有 す る マ ウ ス 並 び に 遺 伝 子 操 作 さ れ た P M C A 「ノ ッ ク ア ウ ト」マ ウ ス の 対 応 す る 表 現 型 の 確 認 は さ ら に、細 胞 性  $C a^{2+}$  調 節 に お け る 各  $C a^{2+}$  ポ ン プ ア イ ソ フ ォ ー ム の 特 異 的 且 つ 必 須 的 な 役 割 の 概 念 を 支 持 す る ( S t r e h l e r & Z a c h a r i a s, P h y s i o l o g i c a l R e v i e w s 2 0 0 1, 8 1 : 2 1 ~ 5 0 )。ヒ ト 形 質 膜 カ ル シ ウ ム A T P ア ー ゼ ア イ ソ フ ォ ー ム 1 ( A T P 2 B 1 又 は P M C A 1 ) の 遺 伝 子 の 完 全 な 構 造 は、1 9 9 3 年 に 解 明 さ れ た ( H i l f i k e r 他、J o u r n a l B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 1 9 9 3, 2 6 8 : 1 9 7 1 7 ~ 1 9 7 2 5 )。こ の 蛋 白 質 は、D N A の 1 0 0 キ ロ ベ ー ス ( k b ) を 超 え る 範 囲 に 及 ぶ 2 1 個 の エ キ ソ ン に よ っ て コ ー ド さ れ る。3 5 k b を 超 え る イ ン ト ロ ン が 翻 訳 開 始 コ ド ン を 含 有 す る エ キ ソ ン か ら 5 非 翻 訳 エ キ ソ ン 1 を 分 離 す る。推 定 プ ロ モ ー タ ー 全 体 及 び 5 隣 接 領 域 は、C p G ア イ ラ ン ド 内 に 入 り 込 ん で お り、数 多 くの S p 1 因 子 結 合 配 列 の 存 在 及 び T A T A ボ ッ ク ス の 欠 如 が 特 徴 で あ る。そ の m R N A は 組 織 の あ ら ゆ る と ころ に 分 布 し て い る の で、こ れ ら の 結 果 は h P M C A 1 遺 伝 子 が ハ ウ ス キ ー ピ ン グ 型 で あ る こ と を 示 唆 し て い る。

#### 【0008】

S t a f f u e r 他 は、選 択 的 ス プ ラ イ シ ン グ の 選 択 肢 及 び 7 種 の 組 織 ( 大 腦 皮 質、骨 格 筋 及 び 心 筋、胃、肝 臓、肺 及 び 腎 臓 ) に お け る、現 在 公 知 の 4 種 の ヒ ト 形 質 膜 カ ル シ ウ ム ポ ン プ ( P M C A ) 遺 伝 子 の 転 写 物 の 定 量 的 組 織 分 布 を 分 析 し た。遺 伝 子 1 及 び 4 の m R N A は、全 組 織 に お い て 同 量 で 存 在 す る こ と が 発 見 さ れ た が、そ の 一 方 で、遺 伝 子 2 及 び 3 の 転 写 物 は、組 織 特 異 的 に 発 現 し て お り、す な わ ち、そ れ ら の 量 は 胎 児 骨 格 筋 及 び 脳 に お い て 最 高 で あ っ た。選 択 的 ス プ ラ イ シ ン グ は、P M C A 転 写 物 内 の 2 種 の 主 要 な 調 節 部 位 ( 部 位 A 及 び C )、ア ミ ノ 末 端 リ ン 脂 質 応 答 領 域 に 隣 接 し た 領 域 及 び カ ル ボ キ シ ル 末 端 カ ル モ ジ ュ リ ン 結 合 ド メ イ ン 内 の 領 域 そ れ ぞ れ に お い て 生 じ る こ と が 発 見 さ れ た。ヒ ト 遺 伝 子 で は 今 ま で に 記 載 さ れ て い な い 新 規 ス プ ラ イ シ ン グ 変 種 が、h P M C A 3 及 び 4 の 部 位 A 並 び に h P M C A 1、2 及 び 3 の 部 位 C で 検 出 さ れ た。遺 伝 子 全 て に つ い て、一 般 的 な ス プ ラ イ シ ン グ 変 種 は 両 ス プ ラ イ シ ン グ 部 位 で 発 見 さ れ た。部 位 A で 一 般 的 な ス プ ラ イ シ ン グ 変 種 の 特 徴 は、小 さ な エ キ ソ ン ( h P M C A 1、3 9 塩 基 対 ( b p ) ; h P M C A 2、4 2 b p ; h P M C A 3、4 2 b p ; h P M C A 4、3 6 b p ) を 含 む こ と で あ る。部 位 C で 一 般 的 な ス プ ラ イ シ ン グ 変 種 で は、1 個 の エ キ ソ ン ( h P M C A 1、1 5 4 b p ; h P M C A 2、2 2 7 b p、h P M C A、1 6 4 b p ; h P M C A 4、1 7 8 b p ) が m R N A で は 排 除 さ れ る。全 遺 伝 子 は 通 常、全 組 織 で こ れ ら の 主 要 な ス プ ラ イ シ ン グ 変 種 を 発 現 し、そ こ で は 対 応 す る ア イ ソ フ ォ ー ム が 存 在 す る。P M C A 2 及 び P M C A 3 の 転 写 物 で は エ キ ソ ン が 追 加 さ れ て 使 用 さ れ る こ と に よ っ て、P M C A 1 及 び 3 で は 単 一 の 選 択 的 ス プ ラ イ シ ン グ 1 6 4 塩 基 対 エ キ ソ ン に お い て 内 部 ス プ ラ イ シ ン グ 部 位 が 追 加 さ れ て 使 用 さ れ る こ と に よ っ て、部 位 C で の ス プ ラ イ シ ン グ の 複 雑 さ が 増 大 す る こ と が 発 見 さ れ た ( S t a u f f e r 他、J o u r n a l B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 1 9 9 3, 2 6 8 : 2 5 9 9 3 ~ 2 6 0 0 3 )。

#### 【0009】

S t a u f f e r 他 に よ っ て P M C A ア イ ソ フ ォ ー ム の 発 現 が 調 べ ら れ た 組 織 の 中 で、大 腦 皮 質 で 転 写 物 の 複 雑 性 が 最 も 高 い こ と が 発 見 さ れ、す な わ ち、大 腦 皮 質 は 遺 伝 子 全 4

10

20

30

40

50

種及び実質的に全ての選択的スプライシングの選択肢の産物を含有していた。遺伝子2のmRNAは、大脳皮質内においてのみかなりの量で検出された(全mRNAの20%)が、遺伝子3のmRNAは、胎児骨格筋及び大脳皮質にほとんど例外なく存在した(全転写物の6%)(Stauffer他、JBC 1993、268:25993~26003)。一般的に、大脳皮質は、これら遺伝子それぞれの転写物を非常に高い相対量で含有することが発見された。PMCA1は、より豊富なアイソフォームであると考えられ、平均比率はPMCA4に対して1:0.67である(Stauffer他、JBC 1993、268、25993~26003)。

#### 【0010】

形質膜Ca<sup>2+</sup>ATPアーゼ(PMCA)ポンプアイソフォーム2、3及び1aは、成体ラットの小脳において大量に発現するが、新生仔では最小限にとどまる。25mM KClはL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを活性化し、細胞基質Ca<sup>2+</sup>を著しく増加させる。培地中のCa<sup>2+</sup>濃度の変化は、ポンプの発現に影響を及ぼした。

10

#### 【0011】

PMCA1は、細胞内カルシウムレベルを活性化閾値未満に減少させる機能とは別に、ラット褐色細胞腫由来細胞において神経突起伸長の機能を果たすことが示された(Brandt他、PNAS 1996、93:13843~13848)。アンチセンスRNAを使用することによってPC6細胞においてPMCA1の産生を阻害すると、神経細胞の分化を指示する神経成長因子(NGF)に应答して神経突起を伸長する能力が損なわれる。形質膜Ca<sup>2+</sup>-ATPアーゼを欠如した細胞では、神経突起の伸長不能は1-インテグリン発現を下方制御した結果であることが示された。

20

#### 【0012】

Brini及び共同研究者等は、チャイニーズハムスターの卵巣細胞で形質膜Ca<sup>2+</sup>ポンプの4種の基本的アイソフォーム及び2種のC末端切断型スプライシング変種PMCA4CII(4a)及び3CII(3a)を過剰発現させることによって、ニューロン特異的アイソフォームPMCA2及び3が、遍在性アイソフォームPMCA1及び4よりもCa<sup>2+</sup>のホメオスタシスを調節するのに有効であることを示した(Brini他、Journal Biological Chemistry 2001、278:24500~24508)。4種の基本的なポンプ変種は全て、天然の細胞内環境においてCa<sup>2+</sup>のホメオスタシスに影響を及ぼした。小胞体における[Ca<sup>2+</sup>]レベル並びに、イノシトール1,4,5-トリリン酸による小胞体貯蔵の放出によって細胞基質及びミトコンドリアにおいて生じる[Ca<sup>2+</sup>]過渡応答の高さは、ポンプの過剰発現によっていずれも減少した。偏在的に発現するアイソフォーム1及び4よりも、ニューロン特異的PMCA2及びPMCA3による影響の方が大きかった。意外なことに、細胞基質及び細胞器官におけるCa<sup>2+</sup>のホメオスタシスへの影響では、切断型PMCA3及びPMCA4の効果は、完全長変種と同じであった。特に、PMCA4CII(4a)は、カルモジュリンに対する親和性は非常に低いにもかかわらず、PMCA4CI(4b)と同じ効果であった。この結果は、カルモジュリンの利用性はインピボにおけるPMCAポンプの変更に重要ではない可能性があることを示している(Brini他、Journal Biological Chemistry 2001、278:24500~24508)。

30

40

#### 【0013】

本明細書及び特許請求の範囲で使用した単数形「a」、「an」及び「the」は、特に指示しなければ複数の内容を含む。たとえば、「細胞(a cell)」はまた、複数の細胞意味する、などである。本明細書及び特許請求の範囲で使用した「及び/又は(and/or)」という用語は、この用語の前後の語句を2者択一か、又は組み合わせて考慮することを意味する。たとえば、「レベル及び/又は活性の測定」という表現は、レベルのみ、又は活性のみ、或いはレベル及び活性の両方を測定することを意味する。本明細書では「レベル」という用語は、mRNAなどの転写物、又は蛋白質若しくはポリペプチドなどの翻訳産物の範囲、又は量の測定値、又は濃度を含むものとする。本明細書では、「活性」という用語は、転写産物又は翻訳産物が生物学的作用をもたらす能力の測定値、

50

或いは生物学的に活性のある分子のレベルの測定値として理解される。「活性」という用語はまた、酵素活性又は生物学的活性及び/又は薬理活性を意味し、これはイオンチャンネル又はイオンチャンネルサブユニットの結合、拮抗、抑制、遮断、中和又は封鎖を意味し、イオンチャンネル又はイオンチャンネルサブユニットの活性化、作動化 (agonization)、上方制御も意味する。「生物学的活性」は、限定はしないが、イオンの膜貫通輸送及び/又は膜貫通イオン流及び/又はそれらの調節を含む。「薬理活性」は、限定はしないが、イオンチャンネル又はイオンチャンネルサブユニットがリガンド、化合物、薬剤、調節剤及び/又は他のイオンチャンネルサブユニットに結合する能力を含む。本明細書では、「レベル」及び/又は「活性」という用語はさらに、遺伝子発現レベル又は遺伝子活性を意味する。遺伝子発現とは、遺伝子に含有される情報を転写及び翻訳によって利用し、遺伝子産物を産生することと定義することができる。「調節異常」とは、遺伝子発現の上方制御又は下方制御を意味する。遺伝子産物は、RNA若しくは蛋白質を含み、遺伝子の発現の結果である。遺伝子産物の量は、遺伝子がどのような活性であるかを測定するために使用することができる。本明細書及び特許請求の範囲で使用した「遺伝子」という用語は、コーディング領域 (エキソン) 及び非コーディング領域 (たとえば、プロモーター又はエンハンサー、イントロン、リーダー及びトレイラー配列などの非コーディング調節因子) の両方を含む。「ORF」という用語は、「オープンリーディングフレーム」の頭字語で、少なくとも1個のリーディングフレーム内に停止コドンを持たず、そのため、潜在的にアミノ酸の配列に翻訳されることができるとされる核酸配列のことである。「調節因子」は、非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター及び遺伝子発現を実行し調節するその他の因子を含む。本明細書では、「断片」という用語は、たとえば、選択的スプライシングされた、又は切断された、そうでなければ切断された転写産物又は翻訳産物を含むことを意味する。本明細書では、「誘導体」という用語は、変異した、若しくはRNA編集された、若しくは化学的修飾された、そうでなければ改変された転写産物、又は変異した、若しくは化学的修飾された、そうでなければ改変された翻訳産物を意味する。明確にする目的のために、たとえば、誘導体転写物は、核酸配列中に、1個以上のヌクレオチド欠失、挿入、又は交換などの改変を有する転写物のことである。誘導体翻訳産物は、たとえば、改変リン酸化、又はグリコシル化、又はアセチル化、又は脂質化などのプロセスによって、或いは改変されたシグナルペプチド切断又はその他の種類の成熟切断によって生成され得る。これらのプロセスは、翻訳後に生じることが可能である。本発明及び特許請求の範囲で使用した「調節剤」という用語は、遺伝子又は遺伝子の転写産物又は遺伝子の翻訳産物のレベル及び/又は活性を変更又は改変することができる分子のことである。「調節剤」は、遺伝子の転写産物又は翻訳産物の生物学的活性を変更又は改変することができることが好ましい。たとえば、前記調節は、生物学的活性及び/又は薬理活性における、酵素活性における増加又は減少、結合特性における変化、或いは遺伝子の前記翻訳産物の生物学的、機能的、又は免疫学的特性のその他の任意の変更又は改変であってよい。「調節剤」とは、増強するか、又は阻害して、そうしてイオンチャンネルサブユニット又はイオンチャンネルの機能特性を「調節」し、イオンチャンネル又はイオンチャンネルサブユニットの結合、拮抗、抑制、遮断、中和又は封鎖を「調節」し、活性化、作動化及び上方制御を「調節」する能力を有する分子を意味する。「調節」はまた、細胞の生物学的活性に影響を及ぼす能力を意味するために使用される。「薬剤」、「試薬」又は「化合物」という用語は、細胞、組織、体液に対して、又は生体系若しくは試験した測定系内において、正若しくは負の生物学的効果を有する物質、化学物質、組成物又は抽出物を意味する。これらは、標的のアゴニスト、アンタゴニスト、部分的アゴニスト又は逆アゴニストであることができる。このような薬剤、試薬又は化合物は核酸、天然若しくは合成のペプチド若しくは蛋白質複合体、又は融合蛋白質であってよい。これらはまた、抗体、有機若しくは非有機の分子若しくは組成物、小分子、薬物及び前記薬剤のいずれかの組み合わせであってよい。これらは、試験、診断又は治療目的で使用することができる。「オリゴヌクレオチドプライマー」又は「プライマー」という用語は、相補的塩基対のハイブリダイゼーションによって所与の標的ポリヌクレオチドとアニールすることができ、ポリメラーゼ

10

20

30

40

50

によって伸長することができる短い核酸配列のことである。これらは、特定の配列に特異的であるように選択されてよく、又は無作為に選択されてよく、たとえば、これらは混合物中に可能な配列全てをもたらす。本明細書で使用したプライマーの長さは、10ヌクレオチドから80ヌクレオチドで変化することができる。「プローブ」は、本明細書で説明し、開示した核酸配列又はそれらに相補的な配列の短い核酸配列である。これらは、所与の配列の完全長配列、又は断片、誘導體、アイソフォーム又は変種を含むことができる。「プローブ」とアッセイした試料との間のハイブリダイゼーション複合体を同定することによって、その試料内のその他の類似配列の存在を検出することが可能である。本明細書では、「相同体又は相同性」は、ヌクレオチド又はペプチド配列の他のヌクレオチド又はペプチド配列に対する関係を説明するために当業界で使用される用語で、比較した前記配列の間の同一性及び/又は類似性の程度によって決定される。当業界では、「同一性」及び「類似性」という用語は、問題とする配列と好ましくは同種のその他の配列(核酸又は蛋白質配列)との互いの一致によって測定されるポリペプチド又はポリヌクレオチド配列の関係の程度を意味する。「同一性」及び「類似性」を計算して決定する好ましいコンピュータプログラム法には、限定はしないがGCG BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul他、J. Mol. Biol. 1990、215:403~410; Altschul他、Nucleic Acids Res. 1997、25:3389~3402; Devereux他、Nucleic Acids Res. 1984、12:387)、BLASTN2.0 (Gish W.、<http://blast.wustl.edu>、1996~2002)、FASTA (Pearson及びLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988、85:2444~2448)、及び最長の重複を有する1対のコンテグを決定し整列させるGCG Gel Merge (Wilbur及びLipman、SIAM J. Appl. Math. 1984、44:557~567; Needleman及びWunsch、J. Mol. Biol. 1970、48:443~453)が含まれる。本明細書では、「変種」という用語は、本発明で開示したポリペプチド及び蛋白質に関して、N末端及び/又はC末端で、及び/又は本発明の天然のポリペプチド又は蛋白質の天然のアミノ酸配列内で、1種以上のアミノ酸が添加及び/又は置換及び/又は欠失及び/又は挿入されているが、本質的な特性は維持している任意のポリペプチド又は蛋白質のことである。さらに、「変種」という用語は、ポリペプチド又は蛋白質の任意の短い又は長い種を含む。「変種」はまた、ATP2B蛋白質のアミノ酸配列、特にATP2B1、配列番号1と少なくとも約80%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、最も好ましくは少なくとも約95%の配列同一性を備えた配列を含む。「変種」は、たとえば、保存性の高い領域において保存的アミノ酸置換を有する蛋白質を含む。本発明の「蛋白質及びポリペプチド」は、ATP2B蛋白質のアミノ酸配列、配列番号1、ATP2B1を含む蛋白質の変種、アイソフォーム、断片及び化学的誘導體を含む。コドンが選択的塩基配列によって他のコドンに置換されているが、DNA配列によって翻訳されたアミノ酸配列は変化しないままである配列変種も含まれる。当業界で公知のこの現象は、特異的アミノ酸に翻訳される一連のコドンの重複性と呼ぶ。機能性に影響を及ぼさないようなアミノ酸の交換、たとえば、リジンに対してアルギニン、ロイシンに対してバリン、グルタミンに対してアスパラギンの交換も含まれる。天然から単離することができる、又は組換え及び/又は合成手段によって生成することができる蛋白質及びポリペプチドも含むことができる。天然の蛋白質又はポリペプチドとは、天然に生じる切断型又は分泌型、天然に生じる変種(たとえば、スプライシング変種)及び天然に生じる対立形質変種のことである。本明細書では、「単離された」という用語は、変化した、及び/又は天然の環境から取り出された、すなわち細胞から、又はそれらが通常生じる生体から単離された、及び天然では関連していることがわかっている共存成分から分離するか、又は本質的に精製された分子又は物質を意味するものと考えられる。この概念はさらに、このような分子をコードする配列を自然の状態では結合しないポリヌクレオチドに人工的に結合させることができたり、このような分子を組換え及び/又は合成手段によって

10

20

30

40

50

生成することができたりすることを意味する。前記の目的のために、このような配列を生きた、又は生きていない生物に当業界で公知の方法によって導入することができるとしても、またこのような配列が前記生物にまだ存在するとしても、それらはまだ単離されたと見なされる。本発明では、「危険性」、「感受性」及び「素因」という用語は同等で、神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病の発症の可能性に関して使用される。

#### 【0014】

「AD」という用語は、アルツハイマー病を意味する。本明細書では、「AD型神経病理学」、「AD病理学」とは、本発明で説明したような、及び従来技術の文献から通常知られているような、神経病理学的、神経生理学的、組織病理学的及び臨床的特徴、徴候及び症状を意味する(Iqbal、Swaab、Winblad及びWisniewski、Alzheimer's Disease and Related Disorders (Etiology, Pathogenesis and Therapeutics)、Wiley & Sons、New York、Weinheim、Toronto、1999; Scinto及びDaffner、Early Diagnosis of Alzheimer's Disease、Humana Press、Totowa、New Jersey、2000; Mayeux及びChristen、Epidemiology of Alzheimer's Disease: From Gene to Prevention、Springer Press、Berlin、Heidelberg、New York、1999; Yonkin、Tanzi及びChristen、Presenilins及びAlzheimer's Disease、Springer Press、Berlin、Heidelberg、New York、1998参照)。「Braak段階」又は「Braak段階付け」という用語は、Braak及びBraakによって提案された基準による脳の分類のことである(Braak及びBraak、Acta Neuropathology 1991、82:239~259、Braak及びBraak、J Neural Transm 1998、53:127~140)。神経原線維濃縮体及び神経網系の分布に基づいて、ADの神経病理学的進行を6段階(段階0から6)に分ける。本発明では、低いBraak段階(0~3)は、アルツハイマー病の徴候を患っていないと考えられる人を表すことができ(「対照」)、Braak段階4から6は、既にアルツハイマー病に罹患した人(「AD患者」)を表すことができる。「対照」から得られた値は、「公知の健康状態」を表す「参照値」であり、「AD患者」から得られた値は、「公知の疾患状態」を表す「参照値」である。Braak段階が高ければ、ADの徴候及び症状を示す可能性又はADの徴候及び症状を発症する危険性が高くなる。神経病理学的に評価するために、すなわち、ADの病理学的変化が認知症の裏に潜む原因である可能性を判断するために、Braak H.によって推奨されている(www.alzforum.org)。

#### 【0015】

本発明による神経変性疾患又は障害には、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮側索硬化症、ピック病、前頭側頭骨認知症、進行性核性麻痺、皮質基底核変性症、脳血管性認知症、多系統萎縮症、嗜銀性顆粒認知症及びその他のタウ蛋白症並びに軽度認知障害が含まれる。神経変性プロセスが関与する他の病状は、たとえば、虚血発作、加齢黄斑変性、ナルコレプシー、運動ニューロン疾患、プリオン病、外傷性神経損傷及び修復、並びに多発性硬化症がある。

#### 【0016】

本発明は、アルツハイマー病患者の脳領域において、互いに比較して、及び/又は同じ年齢の対照の前頭皮質、側頭皮質及び海馬それぞれの組織試料と比較して、ヒト形質膜カルシウムATPアーゼ(ATP2B又はPMCA)遺伝子発現、好ましくはヒト形質膜カルシウムATPアーゼアイソフォーム1(ATP2B1又はPMCA1)の同定、発現差異、調節異常を開示する。このような調節異常は、同じ年齢の健康な対照から得られた試料では観察されない。本発明は、ATP2B1の遺伝子発現がADに冒された脳では変化し、調節が異常になっており、ATP2B1 mRNAレベルが減少し、前頭皮質と比較

10

20

30

40

50

して側頭皮質で下方制御されており、或いは側頭皮質又は海馬と比較して前頭皮質では上昇しているか、又は上方制御されていることを開示する。さらに、本発明は、A T P 2 B 1 発現が、A T P 2 B 1 のレベルが A D 患者の側頭皮質及び前頭皮質では下方制御されている A D 患者の前頭皮質及び側頭皮質と比較して、健康な同じ年齢の対照対象者の前頭皮質と側頭皮質との間では異なることを開示する。同じ年齢の健康な対照から得られた試料を互いに比較すると、このような調節異常は認められない。この調節異常は、おそらく A D に冒された脳における A T P 2 B 1 の病理学的変更に関連するのであろう。

【 0 0 1 7 】

今までのところ、特に A D における A T P 2 B 1 遺伝子発現の調節異常と神経変性疾患の病理との間の関連を示す実験は記載されていない。同様に、A T P 2 B 1 遺伝子又は蛋白質の変異が前記疾患に関連することは記載されていない。本発明で開示したように、A T P 2 B 1 遺伝子及び蛋白質をこのような疾患に結びつけることは、特に前記疾患の診断及び治療のために新しい方法をもたらす。

10

【 0 0 1 8 】

本発明は、A D 患者の特定の脳領域における A T P 2 B 1 をコードする遺伝子の調節異常を開示する。下側頭葉、嗅内皮質、海馬及び扁桃体内のニューロンは、A D では変性プロセスを受ける (Terry 他、Annals of Neurology 1981、10:184~192)。これらの脳領域は主に、学習及び記憶機能の処理に参与し、A D においてニューロン損失及び変性に対する選択的脆弱性を示す。対照的に、前頭皮質、後頭皮質及び小脳内のニューロンは概ね完全なままであり、神経変性プロセスから保護される。A D 患者及び健康で同じ年齢の対照個人の前頭皮質 (F)、側頭皮質 (T) 及び海馬 (H) の脳組織を本明細書で開示した実施例のために使用した。結果として、A T P 2 B 1 及びその対応する転写物及び / 又は翻訳産物は、A D で通常認められる領域選択的神経変性において原因となる役割を担っている。或いは、A T P 2 B 1 は残存する生きた神経細胞に神経保護機能を与えることができる。これらの開示に基づいて、本発明は、診断評価及び予後、並びに神経変性疾患、特に A D の素因の同定のために有用である。さらに、本発明は、このような疾患の治療を受ける患者の診断的モニター方法を提供する。

20

【 0 0 1 9 】

一態様では、本発明は、対象における神経変性疾患を診断又は予測する方法、又は対象の前記疾患を発症する危険性が增大しているかどうか測定する方法、或いは神経変性疾患を有する対象に施された治療の効果をモニターする方法に着目する。この方法は、前記対象から得られた試料中における (i) 形質膜カルシウム A T P アーゼ (A T P 2 B 1) をコードする遺伝子の転写産物、及び / 又は (i i) 形質膜カルシウム A T P アーゼ (A T P 2 B 1) をコードする遺伝子の翻訳産物、及び / 又は (i i i) 前記転写産物又は翻訳産物の断片、若しくは誘導體、若しくは変種のレベル、発現若しくは活性、又は前記レベル、発現及び前記活性の全部を測定すること、並びに前記レベル、発現及び / 又は前記活性を公知の疾患状態 (患者) を表す参照値、及び / 又は公知の健康状態 (対照) を表す参照値、及び / 又は公知の B r a a k 段階を表す参照値と比較すること、並びに前記レベル、発現及び / 又は活性が公知の健康状態を表す参照値と比較して変化しているかどうか、変更しているかどうか、及び / 又は公知の疾患状態を表す参照値と類似又は同等かどうか、及び / 又は前記対象が神経変性疾患を有すること、又は前記対象が前記疾患の徴候及び症状を発症する危険性が增大していることの指標である公知の B r a a k 段階を表す参照値と比較して類似であるかどうかを分析すること、それによって前記対象における前記神経変性疾患を診断又は予測すること、或いは前記対象の前記神経変性疾患を発症する危険性が增大しているかどうかを決定することを含む。「対象における」という表現は、患者を苦しめる疾患に関係する限りでは、開示した方法の結果を意味し、すなわち、前記疾患が対象の「中」にあることを意味する。

30

40

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、本発明で開示したような、核酸配列、又は断片、又はそれらの変種に特有のプライマー及びプローブの構築及び使用に関する。オリゴヌクレオチドプライマー及

50

び/又はプローブは、蛍光、生物発光、磁気又は放射活性物質で特異的に標識することができる。本発明はさらに、前記特異的オリゴヌクレオチドプライマーを適切に組み合わせ使用した、前記核酸配列、又はそれらの断片及び変種の検出及び産生に関する。当業界で周知の方法であるPCR分析は、核酸を含有する試料から前記遺伝子特異的核酸配列を増幅するために、前記プライマーを組み合わせ実施することができる。このような試料は、健康な対象又は病気の対象又は限定されたB r a a k段階の対象のいずれかから得ることができる。増幅が特定の核酸産物を生じるか生じないか、及び長さが異なる断片を得ることができるかできないかは、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の指標となり得る。こうして、本発明は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病に関連することができる調査対象の核酸配列を含む所与の試料における遺伝子変異及び一塩基多形の検出に有用な、核酸配列、オリゴヌクレオチドプライマー、及び長さが少なくとも10塩基から全体のコーディング及び遺伝子配列までのプローブを提供する。この特徴は、迅速なDNAをベースにした診断試験、好ましくはキットの形式の開発においてまた利用される。

10

20

30

40

50

#### 【0021】

他の態様では、本発明は、対象における神経変性疾患の進行をモニターする方法に着目する。前記対象から得られた試料中における(i)形質膜カルシウムATPアーゼ(ATP2B1)をコードする遺伝子の転写産物、及び/又は(ii)形質膜カルシウムATPアーゼ(ATP2B1)をコードする遺伝子の翻訳産物、及び/又は(iii)前記転写産物又は翻訳産物の断片、若しくは誘導体、若しくは変種のレベル、発現若しくは活性、又は前記レベル、発現及び前記活性の全部を測定する。前記レベル、発現及び/又は前記活性は、公知の疾患又は健康状態又は公知のB r a a k段階を表す参照値と比較される。それによって、前記対象における前記神経変性疾患の進行がモニターされる。

#### 【0022】

さらに他の態様では、本発明は、前記疾患について治療する対象から得られた試料中における(i)形質膜カルシウムATPアーゼ(ATP2B1)をコードする遺伝子の転写産物、及び/又は(ii)形質膜カルシウムATPアーゼ(ATP2B1)をコードする遺伝子の翻訳産物、及び/又は(iii)前記転写産物又は翻訳産物の断片、若しくは誘導体、若しくは変種のレベル、発現若しくは活性、又は前記レベル、発現及び前記活性の全部を測定することを含む、神経変性疾患の治療を評価する方法に着目する。前記レベル、発現若しくは前記活性、又は前記レベル、発現及び前記活性の全部は、公知の疾患又は健康状態又は公知のB r a a k段階を表す参照値と比較され、それによって、前記神経変性疾患の治療を評価する。

#### 【0023】

本明細書で特許請求した方法、キット、組換え動物、分子、アッセイ及び本発明の使用の好ましい実施形態では、形質膜のカルシウムポンプをコードする前記ATP2B遺伝子は、形質膜カルシウムATPアーゼ(ATP2B又はPMCA)、ATP2B蛋白質をコードする遺伝子である。さらに好ましい実施形態では、前記ATP2B遺伝子は、形質膜カルシウムATPアーゼアイソフォーム1若しくは2若しくは3若しくは4をコードし、変種1若しくは2若しくは3若しくは4とも呼ばれる。前記ATP2B遺伝子は、形質膜カルシウムATPアーゼアイソフォーム1(ATP2B1若しくはPMCA1)又は変種1をコードすることが好ましい。このATP2Bアイソフォーム1は、配列番号1の蛋白質、ATP2B1をコードするATP2B1遺伝子(遺伝子バンクアクセス番号L14561)によって表される。前記蛋白質のアミノ酸配列は、遺伝子バンクアクセス番号J04027、M95541、M95542、AK024895、AK027053、S49852及びいくつかのESTから構築されたcDNAコンセンサス配列に対応する配列番号2、ATP2B1 cDNAに対応するmRNA配列から推定される(図10参照)。本発明では、ATP2B1はまた、配列番号1の蛋白質をコードする配列番号2の核酸配列を意味する。本発明では、ATP2B1はまた、ヒトATP2B1のコーディング配列(cds)を表す核酸配列の配列番号4を意味する。本発明では、前記配列は、本明細書で使用された用語のように「単離」されている。さらに、本発明では、前記

A T P 2 B 又は A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子はまた、一般的に A T P 2 B 1 遺伝子又は簡単に A T P 2 B 1 と呼ばれる。さらに、A T P 2 B 又は A T P 2 B 1 の蛋白質はまた、一般的に A T P 2 B 1 蛋白質又は簡単に A T P 2 B 1 と呼ばれる。

【0024】

本明細書で特許請求した方法、キット、組換え動物、分子、アッセイ及び本発明の使用のさらに好ましい実施形態では、前記神経変性疾患又は障害はアルツハイマー病 ( A D ) であり、前記対象はアルツハイマー病の徴候及び症状に罹っている。

【0025】

分析し、測定する試料は脳組織又はその他の組織を含む群、或いは体細胞を含む群から選択されることが好ましい。この試料はまた、脳脊髄液又は唾液、尿、糞便、血液、血清血漿、又は粘液を含むその他の体液を含むことができる。好ましくは、本発明による神経変性疾患の診断、予後、進行のモニター又は治療の評価方法は、*ex corpre* ( 体の一部 ) で実施することができ、「インビトロ」で実行され、このような方法は、試料、たとえば、対象若しくは患者から除去、収集、又は単離された体液又は細胞に関連することが好ましい。

10

【0026】

他の好ましい実施形態では、前記参照値は、( i ) A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、及び / 又は ( i i ) A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、及び / 又は ( i i i ) 前記神経変性疾患に罹患していない対象から得られた試料 ( 対照試料、対照 ) 或いは神経変性疾患、特にアルツハイマー病に罹患した対象から得られた、又は限定された B r a a k 段階の人から得られた試料 ( 患者試料、患者 ) における前記転写産物又は翻訳産物の断片、又は誘導體、又は変種のレベル、発現又は活性、或いは前記レベル及び前記活性の両方の値である。

20

【0027】

好ましい実施形態では、公知の健康状態を表す参照値 ( 対照試料 ) に対して、前記対象から得られた試料細胞又は組織、又は体液 ( 患者試料 ) における A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の転写産物及び / 又は A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物及び / 又はそれらの断片、又は誘導體、又は変種のレベル、発現及び / 又は活性の変更、変化したレベル、発現及び / 又は活性が、神経変性疾患、特に A D の診断、又は予後、又は罹患する危険性の増加を示す。

30

【0028】

さらに好ましい実施形態では、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の公知の疾患状態を表す参照値と比較して、前記対象から得られた試料細胞、又は組織、又は体液 ( 患者試料 ) から得られた試料細胞又は組織、又は体液における A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の転写産物及び / 又は A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物及び / 又はそれらの断片、若しくは誘導體、若しくは変種が同等又は類似のレベル、発現及び / 又は活性であることは、前記神経変性疾患の診断、又は予後、又は疾患になる危険性の増加の指標となる。

【0029】

他のさらに好ましい実施形態では、A D の徴候及び症状を発症する高い危険性を反映する公知の B r a a k 段階を表す参照値と比較して、対象から得られた試料細胞、又は組織、又は体液における A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の転写産物及び / 又は A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物及び / 又はそれらの断片、若しくは誘導體、若しくは変種が同等又は類似のレベル及び / 又は活性であることは、A D の診断、又は予後、又は疾患になる危険性の増加の指標となる。

40

【0030】

好ましい実施形態では、A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の転写産物のレベルの測定は、対象の試料から抽出した R N A の逆転写によって得られた c D N A から前記遺伝子特異的配列を増幅するためにプライマーの組み合わせを用いた定量的 P C R 分析を使用して、対象から得られた試料で実施した。プライマーの組み合わせ ( 配列番号 5、配列番

50

号6)は、本発明の実施例(iv)に挙げるが、本発明で開示したような配列から生じたその他のプライマーも使用することができる。前記遺伝子に特異的なプローブを用いてノザンブロット又はリボヌクレアーゼ保護アッセイ(RPA)をまた適用することができる。さらに、チップをベースとしたマイクロアレイ技術によって転写産物を測定することが好ましいであろう。これらの技術は当業者には公知である(Sambrook及びRussell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、2001; Schena M.、Microarray Biochip Technology、Eaton Publishing、Natick、MA、2000)。免疫アッセイの一例は、特許出願国際公開第02/14543号で開示し、記載されたような酵素活性の検出及び測定である。

#### 【0031】

さらに、ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、及び/又は前記翻訳産物の断片、若しくは誘導体、若しくは変種のレベル及び/又は活性、及び/又は前記翻訳産物、及び/又はそれらの断片、若しくは誘導体、若しくは変種の活性レベルは、免疫アッセイ、活性アッセイ、及び/又は結合アッセイを使用して検出できる。これらのアッセイは、前記蛋白質分子と抗蛋白質抗体との間の結合量を、抗蛋白質抗体又はこの抗蛋白質抗体に結合する第2抗体のいずれかに結合させた酵素的、色素原、放射活性、磁気、又は発光標識を使用することによって測定することができる。さらに、その他の親和性の高いリガンドを使用してよい。使用することができる免疫アッセイには、たとえば、ELISA、ウェスタンブロット及び当業者に公知のその他の技術が含まれる(Harlow及びLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1999及びEdwards R、Immunodiagnosics: A Practical Approach、Oxford University Press、Oxford; England、1999)。これらの検出技術は全てまた、マイクロアレイ、蛋白質アレイ、抗体マイクロアレイ、組織マイクロアレイ、電子バイオチップ又は蛋白質チップをベースにした様式で使用することができる(Schena M.、Microarray Biochip Technology、Eaton Publishing、Natick、MA、2000)。

#### 【0032】

好ましい実施形態では、前記疾患の進行をモニターするために、前記対象から期間中採取した一連の試料における(i)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、及び/又は(ii)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、及び/又は(iii)前記転写産物又は翻訳産物の断片、若しくは誘導体、若しくは変種のレベル、発現若しくは活性、又は前記レベル及び前記活性の全てを比較する。さらに好ましい実施形態では、前記対象は治療を受けた後で、前記試料の収集を1回以上回行う。さらに他の好ましい実施形態では、前記レベル及び/又は活性は、前記対象の前記治療の前後に測定する。

#### 【0033】

他の態様では、本発明は、対象における神経変性疾患、特にADを診断若しくは予測するため、又は対象が神経変性疾患、特にADを発症する傾向若しくは素因を測定するため、又は神経変性疾患、特にADを有する対象に施した治療の効果をモニターするためのキットの使用に着目し、前記キットは、

(a)(i)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の転写産物及び/又はそれらの断片、誘導体、変種を選択的に検出する試薬、(ii)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物及び/又はそれらの断片、誘導体、変種を選択的に検出する試薬からなる群から選択された少なくとも1種の試薬、及び

(b) - 前記対象から得られた試料におけるATP2B1をコードする遺伝子の前記転写産物及び/又は前記翻訳産物のレベル、発現又は活性、又は前記レベル、発現及び前記

10

20

30

40

50

活性の全部を測定すること、

- 前記転写産物及び／又は前記翻訳産物の前記レベル及び／又は前記活性及び／又は発現を、公知の疾患状態（患者）を表す参照値及び／又は公知の健康状態（対照）を表す参照値及び／又は公知の B r a a k 段階を表す参照値と比較すること、及び

- 前記レベル及び／又は前記活性及び／又は発現が公知の健康状態を表す参照値と比較して変化しているかどうか、及び／又は公知の疾患状態を表す参照値又は公知の B r a a k 段階を表す参照値と類似しているか、又は同等であるかどうかを分析すること、及び

- 神経変性疾患、特に A D を診断するか、又は予測すること、又は前記対象がこのような疾患を発症する傾向又は素因を測定することによって、神経変性疾患、特に A D を診断、又は予測するため、及び／又は対象がこのような疾患を発症する傾向又は素因を測定するため、又は治療の効果をモニターするための指示書を含み、公知の健康状態（対照）を表す参照値と比較して前記転写産物及び／又は前記翻訳産物のレベル、発現若しくは活性、又は前記レベル及び前記活性の両方が変化又は変更していること、及び／又は前記転写産物及び／又は前記翻訳産物のレベル、発現若しくは活性、又は前記レベル及び前記活性の両方が公知の疾患状態（患者試料）、好ましくは A D の疾患状態（A D 患者）を表す参照値、及び／又は公知の B r a a k 段階を表す参照値と類似しているか、又は同等であることが、神経変性疾患、特に A D の診断若しくは予後、又はこのような疾患を発症する傾向又は素因の増加、A D の徴候及び症状を発症する危険性の高さを示す。本発明によるこのキットは、神経変性疾患、特に A D を発症する危険性がある個体対象の同定に特に有用である。

【 0 0 3 4 】

A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の転写産物及び／又は翻訳産物を選択的に検出する試薬は、様々な長さの配列、配列の断片、抗体、アプタマー、s i R N A、ミクロ R N A、リボザイムであることができる。

【 0 0 3 5 】

他の態様では、本発明は、対象における神経変性疾患、特にアルツハイマー病を診断又は予測する方法、及び対象がこのような疾患を発症する傾向又は素因を測定する方法、及び神経変性疾患、特に A D を有する対象に施された治療の効果をモニターする方法におけるキットの使用に着目する。

【 0 0 3 6 】

したがって、本発明によるキットは、疾患の経過において不可逆的な障害を負う前に、疾患発症前の早期予防措置又は治療行為を行うことを認めた個体対象を標的とするための手段として役立つことができる。さらに、好ましい実施形態では、本発明で着目したキットは、対象における神経変性疾患、特に A D の進行のモニター、並びに前記対象のこのような疾患の治療的処置の成功又は失敗のモニターに有用である。

【 0 0 3 7 】

他の態様では、本発明は、( i ) A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子、及び／又は ( i i ) A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、及び／又は ( i i i ) A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、及び／又は ( i v ) ( i ) から ( i i i ) の断片、又は誘導體、又は変種のレベル、又は活性、又は前記レベル及び前記活性の両方に直接的又は間接的に影響を及ぼす 1 種以上の薬剤の治療有効量又は予防有効量を対象に投与することを含む、前記対象における神経変性疾患、特に A D の治療又は予防の方法に着目する。前記薬剤は、小分子を含んでよく、ペプチド、オリゴペプチド、又はポリペプチドも含んでよい。前記ペプチド、オリゴペプチド、又はポリペプチドは、A T P 2 B 1 蛋白質、又はそれらの断片、又は誘導體、又は変種をコードする遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列を含む。本発明による、神経変性疾患、特に A D を治療又は予防するための薬剤はまた、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、又はポリヌクレオチドから構成されてよい。前記オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドは、A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列をセンス方向又はアンチセンス方向のいずれかで含むことができる。

10

20

30

40

50

## 【0038】

好ましい実施形態では、この方法は、前記1種以上の薬剤を投与するために、それ自体公知の遺伝治療及び/又はアンチセンス核酸技術を適用することを含む。一般的に、遺伝子治療はいくつかの取り組み、すなわち、変異遺伝子の分子置換、治療蛋白質の合成をもたらす新規遺伝子の追加、及び組換え発現法又は薬剤による内在性細胞遺伝子発現の変更を含む。遺伝子輸送技術は、詳細に記載されており(たとえば、Behr、*Acc Chem Res* 1993、26:274~278及びMulligan、*Science* 1993、260:926~931参照)、DNAの細胞への機械的微量注入などの直接遺伝子輸送技術並びに生物ベクター(組換えウイルス、特にレトロウイルスなど)又はリポソームモデルを使用した間接的技術、又はポリカチオンによるDNA共沈殿によるトランスフェクションに基づいた技術、化学物質(溶媒、界面活性剤、ポリマー、酵素)又は物理的手段(機械的、浸透圧、熱、電気ショック)による細胞膜貫通が含まれる。生後の中枢神経系への遺伝子輸送は詳細に述べられている(たとえば、Wolf、*Curr Opin Neurobiol* 1993、3:743~748参照)。

10

## 【0039】

特に、本発明は、アンチセンス核酸治療によって、すなわち、アンチセンス核酸又はそれらの誘導体のある種の重要な細胞に導入することによって不適切に発現した遺伝子、又は欠陥のある遺伝子を下方制御することによって、神経変性疾患を治療又は予防する方法に着目する(たとえば、Gillespie、*DN&P* 1992、5:389~395; Agrawal及びAkhtar、*Trends Biotechnol* 1995、13:197~199; Crooke、*Biotechnology* 1992、10:882~6参照)。ハイブリダイゼーション戦略だけでなく、リボザイム、すなわち酵素として作用するRNA分子を適用して、疾患の情報を携えたRNAを破壊することも記載されている(例えば、Barinaga、*Science* 1993、262:1512~1514参照)。好ましい実施形態では、治療する対象はヒトであり、治療用アンチセンス核酸又はそれらの誘導体は、ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の転写産物を対象とする。対象の中枢神経系、好ましくは脳の細胞をこのような方法で治療することが好ましい。細胞貫通は、アンチセンス核酸及びそれらの誘導体の担体粒子への結合などの公知の戦略、又は前記の技術によって実施することができる。標的治療用オリゴデオキシヌクレオチドを投与する戦略は、当業者には公知の戦略である(例えば、Wickstrom、*Trends Biotechnol* 1992、10:281~287参照)。場合によっては、送達は局所適用するだけで実施できることがある。他の取り組みは、アンチセンスRNAの細胞内発現を対象とする。この戦略では、標的核酸の一領域に相補的なRNAの合成を対象とする組換え遺伝子を用いて、細胞を*ex vivo*で形質転換する。細胞内で発現したアンチセンスRNAの治療的使用は、操作としては遺伝子治療と同じである。別名RNA干渉(RNAi)として知られる、最近開発された2本鎖RNAの使用による遺伝子細胞内発現の調節方法は、核酸治療のもう1つの効果的な取り組みとなり得る(Hannon、*Nature* 2002、418:244~251)。

20

30

## 【0040】

さらに好ましい実施形態では、この方法は、ドナー細胞、又は移植拒絶を最小限に抑えるか、又は減少させるために好ましくは処理されたドナー細胞を、前記対象の中枢神経系、好ましくは脳に移植することを含み、前記ドナー細胞は、1種以上の前記薬剤をコードする少なくとも1個の導入遺伝子を挿入することによって遺伝的に変更されている。前記導入遺伝子を、ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターによって輸送することができる。この導入遺伝子は、導入遺伝子をコードするDNAの非ウイルス性物理的形質移入によって、特にマイクロインジェクションによってドナー細胞に挿入することができる。導入遺伝子の挿入はまた、エレクトロポレーション、化学物質媒介形質移入、特にリン酸カルシウム形質移入又はリポソーム媒介形質移入によって実施することができる(McCelland及びPardee、*Expression Genetics: Accelerated and High-Throughput Methods*、Eat

40

50

on Publishing, Natick, MA, 1999 参照)。

【0041】

好ましい実施形態では、神経変性疾患、特にADを治療及び予防する前記薬剤は、前記対象、好ましくはヒトに、対象細胞を前記対象に導入することを含む方法によって投与することができる治療用蛋白質であり、前記対象細胞は、前記治療用蛋白質をコードするDNA区域を挿入するためにインビトロで処理されており、前記対象細胞は、前記治療用蛋白質の治療有効量を前記対象においてインビボで発現する。前記DNA区域を、ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターによって、インビトロで前記細胞に挿入することができる。

【0042】

本発明による治療法には、既に記載した細胞及び遺伝子治療法のいずれかの組み合わせた、治療用クローニング、移植及び胚性幹細胞又は胚性生殖細胞及び成人神経幹細胞を使用した幹細胞治療の適用が含まれる。幹細胞は、全能性又は多分化能性であってよい。これらはまた、器官特異的であってよい。疾患のある、及び/又は障害のある脳細胞又は組織の修復戦略には、(i)成人組織からドナー細胞を採取することが含まれる。これらの細胞の核を、遺伝物質を除去した非受精卵細胞に移植する。胚性幹細胞は、体細胞核輸送を受けた細胞の胚盤胞段階から単離される。次に、分化因子を使用して、この幹細胞を分化した細胞型、好ましくは神経細胞の制御された発達を導く(Lanza他、Nature Medicine 1999、9:975~977)か、又は(ii)中枢神経系若しくは骨髄(間葉幹細胞)から単離された成人幹細胞をインビトロ増殖及びその後の移植のために精製するか、又は(iii)内在性神経幹細胞の機能的ニューロンへの増殖、移動及び分化を直接誘導する(Peterson DA、Curr. Opin. Pharmacol. 2002、2:34~42)。成人脳の胚中心は神経障害又は機能不全がないので、成人神経幹細胞は、障害を受けた、又は疾患のある脳組織を修復するために非常に有望である(Colman A、Drug Discovery World 2001、7:66~71)。

【0043】

好ましい実施形態では、本発明による治療又は予防のための対象は、ヒト、非ヒト実験動物、たとえば、マウス又はラット、家畜、又は非ヒト霊長類であることができる。非ヒト実験動物は、神経変性疾患のための動物モデル、例えば、AD型神経病理を有するトランスジェニックマウス及び/又はノックアウトマウスであることができる。

【0044】

他の態様では、本発明は、(i)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子、及び/又は(ii)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、及び/又は(iii)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、及び/又は(iv)(i)から(iii)の断片、又は誘導體、又は変種からなる群から選択された少なくとも1種の物質の薬剤、選択的アンタゴニスト又はアゴニスト又は活性、若しくは、レベル、又は前記活性及び前記レベルの両方、及び/又は発現の調節剤に着目し、前記薬剤、選択的アンタゴニスト又はアゴニスト、又は前記調節剤は、神経変性疾患、特にADの治療において潜在的活性を有する。

【0045】

他の態様では、本発明は、前記調節剤及び好ましくは医薬担体を含む医薬組成物に着目する。前記担体とは、一緒に調節剤を投与する希釈剤、補助剤、賦形剤又は媒体を意味する。

【0046】

他の態様では、本発明は、医薬組成物で使用するための(i)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子、及び/又は(ii)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、及び/又は(iii)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、及び/又は(iv)(i)から(iii)の断片、又は誘導體、又は変種からなる群から選択された少なくとも1種の物質の活性、若しくはレベル、若しくは発現又は前記活性及び前記レベ

10

20

30

40

50

ルの両方の調節剤に着目する。

【0047】

他の態様では、本発明は、神経変性疾患、特にADを治療又は予防するための薬剤の製造における(i)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子、及び/又は(ii)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、及び/又は(iii)ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、及び/又は(iv)(i)から(iii)の断片、又は誘導体、又は変種からなる群から選択された少なくとも1種の物質の薬剤、抗体、選択的アンタゴニスト又はアゴニスト、又は活性、若しくはレベル、又は前記活性及び前記レベルの両方、及び/又は発現の調節剤の使用を提供する。前記抗体は、配列番号1を有するATP2B1をコードする遺伝子の翻訳産物である免疫源に特異的に免疫反応性であること

10

【0048】

他の態様では、本発明は、天然ATP2B1遺伝子転写制御要素ではない転写要素の制御下に、配列番号1を有するATP2B1蛋白質をコードする非天然ATP2B1遺伝子配列、又はそれらの断片、又は誘導体、又は変種を含む遺伝子操作された組換え非ヒト動物に着目する。前記組換え非ヒト動物の作製には、(i)前記遺伝子配列及び選択可能なマーカー配列を含有する遺伝子標的構築物を提供すること、及び(ii)前記標的構築物を非ヒト動物の幹細胞に導入すること、及び(iii)前記非ヒト動物幹細胞を非ヒト胚に導入すること、及び(iv)前記胚を偽妊娠非ヒト動物に移植すること、及び(v)前記胚を出産予定日まで成長させること、及び(vi)ゲノムが両対立遺伝子中に前記遺伝子配列の変更を含む遺伝子改変非ヒト動物を同定すること、及び(vii)ゲノムが前記内在性遺伝子の変更を含む遺伝子改変非ヒト動物を得るために段階(vi)の遺伝子改変非ヒト動物を飼育することが含まれ、前記遺伝子は発現が不適切であるか、低いか、又は過剰であり、前記破壊又は改変によって、ADに関連した徴候及び症状である神経変性疾患の徴候及び症状を発症する素因を示す、前記非ヒト動物を生じる。このような動物を作製及び構築するための戦略及び技術は、当業者には公知である(例えば、Capecci、Science 1989、244:1288~1292及びHogan他、Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1994及びJackson及びAbbott、Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach、Oxford University Press、Oxford、England、1999参照)。神経変性疾患、特にアルツハイマー病を研究するための試験動物又は対照動物のような遺伝子操作、組換え非ヒト動物を使用することは好ましい。このような動物は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を治療するための診断薬及び治療薬の開発における化合物、薬剤及び調節剤のスクリーニング、試験及び評価に有用であり得る。スクリーニング法におけるこのような遺伝子改変動物の使用を本発明で開示する。

20

30

【0049】

他の態様では、本発明は、配列番号1を有するATP2B1蛋白質をコードする遺伝子配列、又はそれらの断片、又は誘導体、又は変種の発現が不適切であるか、低いか、又は過剰であるか、又は破壊されているか、又は神経変性疾患、特にアルツハイマー病を治療するための診断薬及び治療薬の開発において化合物、薬剤及び調節剤をスクリーニング、試験及び評価するために他の方法で改変されている細胞を使用する。スクリーニング法におけるこのような細胞の使用を本発明で開示する。

40

【0050】

他の態様では、本発明は、(i)配列番号1を有するATP2B1蛋白質をコードする遺伝子、及び/又は(ii)配列番号1を有するATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、及び/又は(iii)配列番号1を有するATP2B1蛋白質をコードする

50

遺伝子の翻訳産物、及び/又は ( i v ) ( i ) から ( i i i ) の断片、又は誘導体、又は変種からなる群から選択された 1 種以上の物質の発現及び/又はレベル及び/又は活性を改変する能力を有する、神経変性疾患、特に A D、又は関連疾患及び障害の治療に使用するための薬剤、調節剤、選択的アンタゴニスト又はアゴニストをスクリーニングする方法に着目する。このスクリーニング法は、( a ) 細胞を試験化合物と接触させること、及び ( b ) ( i ) から ( i v ) で列挙した 1 種以上の物質の活性及び/又はレベル、又は活性及びレベルの両方、及び/又は発現を測定すること、及び ( c ) 前記試験化合物と接触していない対照細胞において前記物質の活性及び/又はレベル、又は活性及びレベルの両方、及び/又は発現を測定すること、及び ( d ) 段階 ( b ) 及び ( c ) の細胞における物質のレベル及び/又は活性及び/又は発現を比較することを含み、接触した細胞における前記細胞の活性及び/又はレベル及び/又は発現の改変が、前記試験化合物が神経変性疾患及び障害の治療に使用するための薬剤、調節剤、選択的アンタゴニスト又はアゴニストであることを示す。前記細胞は、本発明で開示したような細胞であってよい。

10

#### 【 0 0 5 1 】

他の一態様では、本発明は、( a ) 試験化合物を神経変性疾患又は関連疾患若しくは障害の徴候及び症状を発症しやすい、又は既に発症しており、本発明で開示したような動物モデルであってよい非ヒト試験動物に投与すること、及び ( b ) ( i ) から ( i v ) で列挙した 1 種以上の物質の活性及び/又はレベル及び/又は発現を測定すること、及び ( c ) 神経変性疾患又は関連疾患若しくは障害の徴候及び症状を同様に発症しやすい、又は既に発症しており、このような試験化合物を投与されていない非ヒト対照動物における前記物質の活性及び/又はレベル及び/又は発現を測定すること、及び ( d ) 段階 ( b ) 及び ( c ) の動物におけるこの物質の活性及び/又はレベル及び/又は発現を比較し、非ヒト試験動物における物質の活性及び/又はレベル及び/又は発現の改変が、前記試験化合物が神経変性疾患及び障害の治療に使用するための薬剤、調節剤、選択的アンタゴニスト又はアゴニストであることを示すことを含む、薬剤、調節剤又は選択的アンタゴニスト若しくはアゴニストが ( i ) 配列番号 1 を有する A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子、及び/又は ( i i ) 配列番号 1 を有する A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、及び/又は ( i i i ) 配列番号 1 を有する A T P 2 B 1 蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、及び/又は ( i v ) ( i ) から ( i i i ) の断片、又は誘導体、又は変種からなる群から選択された 1 種以上の物質の発現及び/又はレベル及び/又は活性を改変する能力を有する、神経変性疾患、特に A D 又は関連疾患及び障害の治療で使用するための薬剤、調節剤、選択的アンタゴニスト又はアゴニストのスクリーニング方法に着目する。

20

30

#### 【 0 0 5 2 】

他の実施形態では、本発明は、( i ) 前記のスクリーニング法の方法によって神経変性疾患の調節剤を同定する段階、及び ( i i ) 調節剤を医薬担体と混合する段階を含む医薬品の製造方法を提供する。しかし、前記調節剤はまた、その他の種類のスクリーニング法及び測定法によって同定することができる。

#### 【 0 0 5 3 】

他の態様では、本発明は、リガンドと配列番号 1 を有する A T P 2 B 1 蛋白質、又はそれらの断片、又は誘導体、又は変種との間の結合を阻害する化合物を試験する、好ましくは複数の化合物をスクリーニングする測定法を提供する。前記スクリーニングアッセイは、( i ) 配列番号 1 を有する前記 A T P 2 B 1 蛋白質、又はそれらの断片、又は誘導体、又は変種の液体懸濁物を複数の容器に添加する段階、及び ( i i ) 前記阻害についてスクリーニングする 1 種以上の化合物を前記複数の容器に添加する段階、及び ( i i i ) 検出可能な、好ましくは蛍光標識されたリガンドを前記容器に添加する段階、及び ( i v ) 前記 A T P 2 B 1 蛋白質、又はそれらの前記断片、又は誘導体又は変種及び前記化合物以上の化合物、及び前記検出可能な、好ましくは蛍光標識されたリガンドをインキュベートする段階、及び ( v ) 前記 A T P 2 B 1 蛋白質、又はそれらの前記断片、又は誘導体、又は変種に関連した好ましくは蛍光の量を測定する段階、及び ( v i ) 1 種または複数の前記化合物による前記リガンドの前記 A T P 2 B 1 蛋白質、又はそれらの前記断片、又は誘導

40

50

体、又は変種への結合の阻害の程度を測定する段階を含む。リガンドと前記 ATP2B1 翻訳産物との間の結合の阻害を測定するために、対応する蛋白リボソームを作製するように、前記 ATP2B1 翻訳産物、又はその断片、又は誘導体、又は変種を人工的リボソームに再構成することが好ましい可能性がある。界面活性剤からリボソームへの ATP2B1 翻訳産物の再構成方法は、詳細に記載されている (Schwarz 他、Biochemistry 1999、38:9456~9464; Krivosheev 及び Usanov、Biochemistry - Moscow 1997、62:1064~1073)。いくつかの態様では、蛍光標識リガンドを使用する代わりに、当業者には公知の任意のその他の検出可能な標識、例えば、放射活性標識を使用し、それに応じて検出することが好ましい。前記方法は、新規化合物を同定するため、並びに、ATP2B1 蛋白質をコードする遺伝子の遺伝子産物、又はその断片、又は誘導体、又は変種に対するリガンドの結合を阻害する能力が改善されたか、又は他の場合では最適化された化合物を評価するために有用であり得る。担体粒子の使用に基づいたこの場合の蛍光結合アッセイの一例は、特許出願国際公開 00/52451 号に開示され記載されている。他の例は、特許国際公開 02/01226 号に記載されたような競合アッセイ法である。本発明のスクリーニングアッセイのために好ましいシグナル検出法は、以下の特許出願、国際公開 96/13744 号、国際公開 98/16814 号、国際公開 98/23942 号、国際公開 99/17086 号、国際公開 99/34195 号、国際公開 00/66985 号、国際公開 01/59436 号、国際公開 01/59416 号に記載されている。

10

20

**【0054】**

他の一実施形態では、本発明は、(i) 前記の阻害結合アッセイによってリガンドと ATP2B1 をコードする遺伝子の遺伝子生成物との間の結合の阻害剤としての化合物を同定する段階、及び (ii) この化合物を医薬担体と混合する段階を含む医薬品の製造方法を提供する。しかし、前記化合物はまた、その他の種類のスクリーニング法によって同定することができる。

**【0055】**

他の態様では、本発明は、前記化合物の配列番号 1 を有する ATP2B1 蛋白質、又はそれらの断片、又は誘導体、又は変種への結合を阻害する程度を測定するために化合物を試験する、好ましくは複数の化合物をスクリーニングする測定法に着目する。前記スクリーニングアッセイは、(i) 前記 ATP2B1 蛋白質、又はそれらの断片、又は誘導体、又は変種の液体懸濁液を複数の容器に添加すること、及び (ii) 前記結合についてスクリーニングする、検出可能な、好ましくは蛍光標識された化合物以上の検出可能な、好ましくは蛍光標識された化合物を前記複数の容器に添加すること、及び (iii) 前記 ATP2B1 蛋白質、又はそれらの前記断片、又は誘導体又は変種及び前記検出可能な、好ましくは蛍光標識された化合物又は検出可能な、好ましくは蛍光標識された化合物類をインキュベートすること、及び (iv) 前記 ATP2B1 蛋白質、又はそれらの前記断片、又は誘導体、又は変種に関連した好ましくは蛍光の量を測定すること、及び (v) 前記 ATP2B1 蛋白質、又はそれらの前記断片、又は誘導体、又は変種に対する 1 種以上の前記化合物による結合の程度を測定することを含む。この種の測定法では、蛍光標識を使用することが好ましい可能性がある。しかし、その他の種類の検出可能な標識も使用することができる。この種の測定法ではまた、本発明で説明したように、ATP2B1 翻訳産物又はその断片、又は誘導体、又は変種を人工リボソームに再構成することが好ましい可能性がある。前記測定方法は、新規化合物を同定するため、並びに、ATP2B1 蛋白質、又はその断片、又は誘導体、又は変種に結合する能力が改善されたか、又は他の場合では最適化された化合物を評価するために有用であり得る。

30

40

**【0056】**

他の一実施形態では、本発明は、(i) 前記の阻害結合アッセイによって ATP2B1 をコードする遺伝子の遺伝子生成物への結合剤としての化合物を同定する段階、及び (ii) この化合物を医薬担体と混合する段階を含む医薬品の製造方法を提供する。しかし、前記化合物はまた、その他の種類のスクリーニング法によって同定することができる。

50

## 【0057】

他の実施形態では、本発明は、本明細書で特許請求したスクリーニング方法による方法のいずれかによって得ることができる薬剤を提供する。他の一実施形態では、本発明は、本明細書で特許請求したスクリーニング方法による方法のいずれかによって得ることができる医薬品を提供する。

## 【0058】

本発明は、配列番号1の蛋白質分子の使用に着目し、A T P 2 B 1の前記蛋白質分子は神経変性疾患、特にアルツハイマー病を検出するための診断標的としての、A T P 2 B 1をコードする遺伝子、又はその断片、又は誘導体、又は変種の翻訳産物である。

## 【0059】

本発明はさらに、配列番号1の蛋白質分子の使用に着目し、A T P 2 B 1の前記蛋白質分子は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を予防、又は治療、又は改善する試薬又は化合物のためのスクリーニング標的として、A T P 2 B 1をコードする遺伝子の翻訳産物又はその断片、又は誘導体、又は変種である。

## 【0060】

本発明は、免疫原に対して特異的に免疫反応性である抗体に着目し、前記免疫原はA T P 2 B 1蛋白質、配列番号1をコードする遺伝子の翻訳産物、又はその断片、又は誘導体、又は変種である。この免疫原は、前記遺伝子の翻訳産物の免疫原又は抗原エピトープ又は部分を含むことができ、翻訳産物の前記免疫原又は抗原部分はポリペプチドであり、前記ポリペプチドは、動物において抗体応答を惹起し、前記ポリペプチドは前記抗体によって免疫特異的に結合される。抗体の作製方法は当業界では周知である(Harlow他、Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1988参照)。本発明で使用した「抗体」という用語は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、リコンビナトリアル、抗イディオタイプ、ヒト化、又は一本鎖抗体、並びにそれらの断片などの当業界で公知の抗体の全形態を包含する(Dubel及びBreitling、Recombinant Antibodies、Wiley-Liss、New York、NY、1999参照)。本発明の抗体は、例えば、酵素免疫測定法(例えば、酵素結合免疫吸着測定法、ELISA)、放射性免疫測定法、化学ルミネセンス免疫測定法、ウェスタンブロット、免疫沈殿及び抗体マイクロアレイなどの従来技術をベースにした様々な診断方法及び治療方法において有用である(Harlow及びLane、Using Antibodies：A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1999及びEdwards R.、Immunodiagnosics：A Practical Approach、Oxford University Press、Oxford、England、1999参照)。これらの方法は、A T P 2 B 1遺伝子の翻訳産物、又はそれらの断片、又は誘導体、又は変種の検出を含む。

## 【0061】

本発明の好ましい実施形態では、前記抗体は、前記細胞の前記抗体による免疫細胞化学的染色を含む、対象から得られた試料における細胞の病理学的状態の検出に使用することができ、公知の健康状態を表す細胞と比較して、前記細胞における染色の変化の程度、又は変化した染色パターンが前記細胞の病理学的状態を示す。この病理学的状態は、神経変性疾患、特にADに關与することが好ましい。細胞の免疫細胞化学的染色は、当業界で周知のいくつかの様々な実験方法によって実施することができる。しかし、抗体結合を検出するための自動化方法を適用することが好ましく、細胞の染色の程度の測定、又は細胞の細胞又は細胞内染色パターンの測定、又は細胞表面上又は細胞器官及び細胞内のその他の細胞内構造物中の抗原の形態学的分布は、米国特許第6150173号に記載された方法によって実施される。

## 【0062】

本発明のその他の特徴及び利点は、例示するのみであって、いかなる方法であってもこの開示の残部を制限するものではない以下の図面の説明及び実施例から明らかであろう。

【0063】

図1は、蛍光ディファレンシャルディスプレイスクリーニングにおいて、ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子、ATP2B1の発現差異の初期の同定を示した図である。この図は、大量調製用蛍光ディファレンシャルディスプレイゲルの切り取ったものを示す。健康な対照対象者2人及びAD患者6人の前頭皮質(F)及び側頭皮質(T)のPCR産物を変性ポリアクリルアミドゲルに2連で添加した(左から右へ)。対応する1塩基アンカーオリゴヌクレオチド及び特異的Cy3標識ランダムプライマーで個々のcDNAを増幅することによって、PCR産物が得られた。矢印は、健康な対照と比較して、AD患者の前頭皮質及び側頭皮質から得られたATP2B1遺伝子の転写産物のシグナルの強度に有意な差が存在する移動位置を示す。この発現差異は、AD患者の前頭皮質と比較して、及び健康な対照対象者の側頭皮質と比較して、側頭皮質中のヒトATP2B1遺伝子転写が下方制御されていることを反映している。健康な非AD対照対象者の側頭皮質及び前頭皮質から得られたシグナルを互いに比較して、シグナル強度の差、すなわち、発現レベルの変更は検出できない。

10

【0064】

図2および3は、定量RT-PCR分析を用いたAD脳組織におけるATP2B1をコードするATP2B1遺伝子の発現差異の証拠を示した図である。AD患者の前頭皮質(F)及び側頭皮質(T)(図2a)および前頭皮質(F)及び海馬(H)(図3a)から収集したRNA試料からのRT-PCR産物の定量は、LightCycler高速熱サイクリング技術によって実施した。同様に、健康な、同じ年齢の対照個体の試料を比較した(前頭皮質及び側頭皮質については図2b、前頭皮質及び海馬については図3b)。データは、遺伝子発現レベルに有意な差を示さない一連の標準遺伝子の結合平均値に対して正規化した。前記一連の標準遺伝子は、サイクロフィリンB、リボソーム蛋白質S9、トランスフェリン受容体、GAPDH及びベータアクチンから構成された。この図は、蛍光で測定された増幅物質の量に対してサイクル数をプロットすることによって増幅の動力学を示す。反応の対数増殖期における正常対照個体の前頭皮質及び側頭皮質の両方、及び正常対照個体の前頭皮質及び海馬それぞれのATP2B1 cDNAの増幅動力学は近接している(図2b及び3b、矢印)が、アルツハイマー病では(図2a及び図3a、矢印)対応する曲線に有意な分離があることに注意すると、それぞれ分析した脳領域におけるATP2B1をコードする遺伝子ATP2B1の発現差異が示され、前頭皮質に対して側頭皮質、及び前頭皮質に対して海馬それぞれにおける、ヒトATP2B1遺伝子、又はその断片、又は誘導体、又は変種の転写産物の調節異常、好ましくは下方制御が示される。

20

30

【0065】

図4は、98%信頼度での中央値の統計学的方法を使用して、対照とAD期を比較することによって、ATP2B1の絶対的mRNA発現の分析を示した図である。このデータは、Braak段階0から1、Braak段階0から2、又はBraak段階0から3のいずれかの対象を含む限定対照群によって計算され、Braak段階2から6、Braak段階3から6及びBraak段階4から6それぞれを含む限定されたAD患者群について計算されたデータと比較された。さらに、Braak段階0から1、Braak段階2から3、及びBraak段階4から6いずれかの対象を含む3種の群それぞれを互いに比較した。AD患者の前頭皮質(F)及び下前頭皮質(T)及び対照の前頭皮質(F)及び下前頭皮質(T)を互いに比較すると有意差が検出された。前記の差は、対照者の側頭皮質及び前頭皮質に対するAD患者の側頭皮質及び前頭皮質におけるATP2B1の下方制御及びAD患者の前頭皮質と比較した側頭皮質におけるATP2B1の下方制御を反映している。前記有意差は、Braak段階3でも観察された。

40

【0066】

図5は、配列番号1、ATP2B蛋白質ATP2B1のアミノ酸配列を示した図である。完全長ヒトATP2B1蛋白質は、1176個のアミノ酸を含む。

50

## 【 0 0 6 7 】

図 6 は、配列番号 2、ゲノムデータベース mRNA 及び EST (図 10) から構築された、5178 個のヌクレオチドを含むヒト ATP2B1 cDNA のヌクレオチド配列を示した図である。

## 【 0 0 6 8 】

図 7 は、配列番号 3、ディファレンシャルディスプレイ及びその後のクローニングによって同定され、得られた ATP2B1 cDNA 断片 644 bp のヌクレオチド配列 (5' から 3' 方向の配列) を示した図である。

## 【 0 0 6 9 】

図 8 は、配列番号 4 のヌクレオチド配列、3351 個のヌクレオチドを含み、配列番号 2 のヌクレオチド 182 から 3712 を有するヒト ATP2B1 遺伝子のコーディング配列 (c d s) を示した図である。

10

## 【 0 0 7 0 】

図 9 は、配列番号 3 の 640 塩基対に対するヒト ATP2B1 cDNA のヌクレオチド配列、配列番号 2 の配列整列の概略を示した図である。

## 【 0 0 7 1 】

図 10 は、配列番号 2 及びゲノムデータベース配列断片からの ATP2B1 のコーディング配列 (c d s) の整列の概略図で、コンセンサス cDNA 配列、遺伝子バンク mRNA 及び EST 配列断片に基づいて得られた、延長修正コンセンサス配列からなる。対応するアクセッション番号は、左側に示す。

20

## 【 0 0 7 2 】

図 11 は、ATP2B1 をコードする cDNA 配列、配列番号 2、同定された cDNA 断片配列、配列番号 3、ATP2B1 転写レベルプロファイリングに使用した両プライマー配列 (プライマー A、プライマー B) 及び ATP2B1 のコーディング配列 (c d s)、配列番号 4 の整列を示した概略図である。配列位置は、右側に示す。

## 【 0 0 7 3 】

図 12 に、本明細書で内部参照番号 P010、P011、P012、P014、P016、P017、P019、P038、P040、P041、P042、P046、P047、P048、P049 によって識別した AD 患者 15 人及び本明細書で内部参照番号 C005、C008、C011、C012、C014、C025、C026、C027、C029、C030、C031、C032、C033、C034、C035、C036、C038、C039、C041、C042、DE02、DE03、DE05、DE07 で識別した同じ年齢の対照固体 25 人の前頭皮質に対する側頭皮質における ATP2B1 遺伝子発現レベルを示した。側頭皮質での上方制御については、示した値は本明細書に記載した式 (以下参照) によって計算され、前頭皮質における上方制御の場合は、計算値は逆方向にそれぞれ示される。棒グラフは、様々な Braak 段階 (0 から 6) における、前頭皮質に対する側頭皮質の個々の自然体数値、 $\ln (IT / IF)$  及び側頭皮質に対する前頭皮質制御因子の自然体数値、 $\ln (IF / IT)$  を視覚化する。

30

## 【 0 0 7 4 】

図 13 に、本明細書では内部参照番号 P010、P011、P012、P014、P016、P019 (0.16 から 0.70 倍) で識別した AD 患者 6 人及び本明細書では内部参照番号 C004、C008 (0.58 から 0.80 倍) で識別した健康な、同じ年齢の対照固体 2 人の、ATP2B1 をコードする ATP2B 遺伝子について、前頭皮質に対する海馬での遺伝子発現レベルを示した。示した値は、本明細書で説明した式によって計算された (以下参照)。散布図は、対照試料 (黒丸) 及び AD 患者試料 (三角) における前頭皮質に対する海馬の制御比の個々の対数値、 $\log (HC / IF \text{ 比})$  を視覚化する。

40

## 【 0 0 7 5 】

図 14 は、ヤギポリクローナル抗 ATP2B1 (抗 PMCA1) 抗血清 (緑色のシグナル) (拡大率 10x) で免疫標識した対照供与者 (対照 T) 及びアルツハイマー患者 (患者 T) の下側頭回の画分でデジタル撮影した顕微鏡写真を例示した図である (倍率 10x

50

)。A T P 2 B 1の全体的免疫反応は、大脳皮質（C T）及び白質（W M）において認められた。図1 4 A及び1 4 Eは、ニューロン特異的マーカーN e u Nに対する抗体で染色したニューロン（ニューロン核及び細胞体）の免疫反応性を示す。図1 4 B及び1 4 Fは、抗A T P 2 B 1ヤギポリクローナル抗血清による免疫染色から得られたシグナルを示す。図1 4 Cは、写真1 4 A、1 4 Bの混合及びD A P I染色から得られた写真を示し、図1 4 Gは、写真1 4 E、1 4 F及びD A P I染色から得られた写真を示し、色はN e u N（赤）、A T P 2 B 1（緑）から検出された免疫シグナル及びD A P I（青）による核染色を指定する。A T P 2 B 1の免疫反応は、ほとんどのニューロン（細胞質、形質膜）で検出され、その上星状膠細胞及びいくつかの乏突起膠細胞で弱く検出されるが、小膠細胞では検出されなかった。本明細書で例示したデータは、A T P 2 B 1蛋白質の神経免疫反応の強度及び量のレベルは、正常人の下側頭皮質（図1 4 C及び1 4 B）と比較して、及び患者及び対照両方の前頭皮質（図1 5 G、1 5 F及び図1 5 C、1 5 B）と比較して、患者の下側頭皮質（図1 4 G及び1 4 F）では減少していることを明らかに示す。さらに、対照の画分と比較して、星状膠細胞A T P 2 B 1免疫反応は患者の前頭及び側頭標本の両方で減少している。

10

20

30

40

50

#### 【0076】

図1 5は、ヤギポリクローナル抗A T P 2 B 1（抗P M C A 1）抗血清（緑色のシグナル）で免疫標識した対照提供者（対照F）及びアルツハイマー患者（患者F）の前頭皮質の画分からデジタル撮影した顕微鏡写真を例示した図である（倍率10×）。A T P 2 B 1の全体的免疫反応は、大脳皮質（C T）及び白質（W M）において認められた。図1 5 A及び1 5 Eは、ニューロン特異的マーカーN e u Nに対する抗体で染色したニューロン（ニューロン核及び細胞体）の免疫反応性を示す。図1 5 B及び1 5 Fは、抗A T P 2 B 1ヤギポリクローナル抗血清による免疫染色から得られたシグナルを示す。図1 5 Cは、写真1 5 A、1 5 Bの混合及びD A P I染色から得られた写真を示し、図1 5 Gは、写真1 5 E、1 5 F及びD A P I染色から得られた写真を示し、色はN e u N（赤）、A T P 2 B 1（緑）から検出された免疫シグナル及びD A P I（青）による核染色を指定する。A T P 2 B 1の免疫反応は、ほとんどのニューロン（細胞質、形質膜）で検出され、その上星状膠細胞及びいくつかの乏突起膠細胞で弱く検出されるが、小膠細胞では検出されなかった。本明細書で例示したデータは、患者の前頭皮質（図1 5 G及び1 5 F）のA T P 2 B 1蛋白質の神経免疫反応の強度及び量のレベルが、正常人の前頭皮質（図1 5 C及び1 5 B）と比較して同等か又は類似しているが、対照並びに患者の前頭皮質では、患者の側頭皮質（図1 4 G及び1 4 F）と比較して上昇していることを明らかに示す。さらに、対照の画分と比較して、星状膠細胞A T P 2 B 1免疫反応は患者の前頭及び側頭標本の両方で減少している。

#### 【実施例1】

##### 【0077】

##### (i) A D患者の脳組織分析

A D患者及び同じ年齢の対照対象者の脳組織を平均して死後6日以内に収集し、すぐにドライアイス上で凍結した。組織病理学的に診断を確定するために、各組織の切片試料をパラホルムアルデヒドで固定した。発現差異分析用の脳領域を確認し、R N A抽出を実施するまで-80 で保存した。

##### 【0078】

##### (ii) 全m R N Aの単離

R N e a s yキット（Q i a g e n）を使用し、製造者のプロトコールに従って、全R N Aを死後脳組織から抽出した。正確なR N A濃度及びR N A品質は、A g i l e n t 2100 B i o a n a l y z e r（A g l i e n t T e c h n o l o g i e s）を使用してD N A L a b C h i pシステムで測定した。調製したR N Aをさらに品質検査するために、すなわち、部分分解の除去及びD N A汚染の検査のために、特異的に設計したイントロンのG A P D Hオリゴヌクレオチド及び参考対照としてのゲノムD N Aを使用して、製造者（R o c h e）によって供給されたプロトコールに記載されたように、L i g

htCycler技術で融解曲線を作製した。

【0079】

(iii) cDNA合成及び蛍光ディファレンシャルディスプレイ(FDD)による差別的に発現した遺伝子の同定:

様々な組織における遺伝子発現の変化を同定するために、変更し、改善したディファレンシャルディスプレイ(DD)スクリーニング法を使用した。元のDDスクリーニング法は、当業者には公知である(Liang及びPardee、Science 1995、267:1186~7)。この技術は、2種のRNA集団を比較し、1集団では発現するが、その他の集団では発現しない遺伝子のクローンをもたらす。いくつかの試料を同時に分析し、上方制御遺伝子及び下方制御遺伝子の両方を同じ実験で同定することができる。DD法におけるいくつかの段階の調節及び改良、並びに技術的変数の変更、例えば、重複性の増加、全RNAの逆転写用の最適試薬及び条件の評価、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の最適化及びそれらの産物の分離によって、再現性が高く、感受性の高い結果を可能にする技術が開発された。適用された改良DD技術は、Kammer他(Nucleic Acids Research 1999、27:2211~2218)によって詳細に記載された。特異的に設計された一連の64個のランダムプライマーは、可能なRNA種全ての統計学的総合分析を実施するために開発された(標準設定)。さらに、この方法は、蛍光標識プライマーの使用をベースにした調製用DDスラブゲル技術を創出するために変更された。本発明では、アルツハイマー病患者及び同じ年齢の対照対象者から注意深く選択された死後脳組織(前頭皮質及び側頭皮質)のRNA集団を比較した。DD分析用の開始物質として、前記(ii)で説明したように抽出した全RNAを使用した。それぞれのRNAの同量0.05µgを、各dNTP0.5mM、Sensiscript逆転写酵素1µl及び1×RT緩衝液(Qiagen)、RNアーゼ阻害剤(Qiagen)10U及び1塩基アンカーオリゴヌクレオチドHI11A、TH11G又はHT11Cのいずれか1µMを含有する反応液20µl中で、cDNAに転写した(Liang他、Nucleic Acids Research 1994、22:5763~5764; Zhao他、Biotechniques 1995、18:842~850)。逆転写は、37 60分、最終変性段階93 5分で行った。Cy3標識ランダムプライマー(1µM)のいずれか1種、1×GeneAmp PCR緩衝液(Applied Biosystems)、MgCl2(Applied Biosystems)1.5mM、dNTP-Mix(dATP、dGTP、dCTP、dTTP Amersham Pharmacia Biotech)2µM、5%DMSO(Sigma)、Ampli Taq DNAポリメラーゼ(Applied Biosystems)1Uと共に対応する1塩基アンカーオリゴヌクレオチド(1µM)を使用して、最終量20µlで、得られた各cDNA 2µlにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。PCR条件は以下のように設定した:94 30秒で変性、1 /秒で40 に冷却、40 4分でプライマーの低厳密性アニーリング、1 /秒で72 まで加熱、72 1分で伸長を1回。この手順の後、高厳密性サイクルを39回行った:94 30秒、1 /秒で60 に冷却、60 2分、1 /秒で72 まで加熱、72 で1分。最後のサイクルに72 5分の1段階を付け加えた(PCRサイクラー:Multi Cycler PCT 200、MJ Research)。DNA添加緩衝液8µlをPCR産物調製物20µlに添加し、5分間変性し、ゲルに添加するまで氷上で保持した。それぞれ3.5µlを、厚さ0.4mm、6%アクリルアミド(Long Ranger)/尿素7Mの配列決定ゲルで、スラブゲルシステム(Hitachi Genetic Systems)によって、2000V、60W、30mAで1時間40分分離した。電気泳動が完了した後、ゲルをFMBIO II蛍光スキャナー(Hitachi Genetic Systems)で、適切なFMBIO II Analysis 8.0ソフトウェアを使用して調べた。全範囲写真を印刷し、差別的に発現したバンドに印を付け、ゲルから切り出し、1.5ml容器に移し、滅菌水200µlを注ぎ、抽出するまで-20 で保持した。

【0080】

10

20

30

40

50

DD産物の溶出及び再増幅：H<sub>2</sub>O 200 μl 中で10分間煮沸し、氷上で冷却し、エタノール (Merck) 及びグリコーゲン/酢酸ナトリウム (Merck) を -20 で一晩使用することによって上清液から沈殿させ、その後4 で13000 rpmで25分間遠心することによって、異なるバンドをゲルから抽出した。ペレットを氷冷エタノール (80%) で2回洗浄し、10mM Tris pH 8.3 (Merck) に再懸濁し、0.025 μm VSWP膜 (Millipore) で10%グリセロール (Merck) に対して室温で1時間透析した。得られた調製物を鋳型として使用して、DD PCR (前記参照) で使用したような対応するプライマー対を含有するPCR混合物25 μl 中において、初回の94 5分、その後94 45秒、60 45秒、1 /秒で上昇させて70 で45秒を15回、そして72 5分1回の最終段階以外は同一条件下で、高厳密性サイクル15回によって増幅した。

10

#### 【0081】

DD産物のクローニング及び配列決定：再増幅したcDNAをDNA Lab Chip システム (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) で分析して、pCR-Blunt II-TOPOベクターに連結して、製造者の指示に従ってE. coli Top10F'細胞に形質転換した (Zero Blunt TOPO PCRクローニングキット, Invitrogen)。クローニングされたcDNA断片は市販の配列決定施設によって配列決定された。ATP2B1蛋白質をコードするATP2B遺伝子のこのような1FDD実験の結果を図1に示す。

20

#### 【0082】

(iv) 定量RT-PCRによる発現差異の確認。

#### 【0083】

側頭皮質対前頭皮質及び海馬対前頭皮質における異なるATP2B1遺伝子発現の肯定的な裏付けは、LightCycler技術 (Roche) を使用して実施した。この技術は、ポリメラーゼ連鎖反応の高速熱サイクリング並びに増幅中の蛍光シグナルのリアルタイム測定が特徴で、したがって、終点値よりも速度論を使用することによってRT-PCR産物の精度の高い測定が可能である。AD患者及び健康な同じ年齢の対照個体の側頭皮質、AD患者及び健康な同じ年齢の対照個体の前頭皮質、AD患者及び健康な同じ年齢の対照個体の海馬のATP2B1 cDNAの割合並びにAD患者及び健康な同じ年齢の対照個体の側頭皮質及び前頭皮質のATP2B1 cDNAの割合並びにAD患者及び健康な同じ年齢の対照個体の海馬及び前頭皮質のATP2B1 cDNAの割合それぞれを測定した (相対的定量)。

30

#### 【0084】

前頭皮質組織 (F) 及び下側頭皮質組織 (T) の間のATP2B1のmRNA発現プロファイリングは、Braak段階当たり4個から9個までの組織で分析した。Braak 3の病状を有する提供者1名では品質の高い組織が欠如していたので、さらにBraak 2の病状を有する提供者1名の組織を含め、Braak 6の病状を有する提供者1名では品質の高い組織が欠如していたので、さらにBraak 5の病状を有する提供者1名の組織試料を含めた。

40

#### 【0085】

プロファイリング分析のために、2種類の一般的な取り組みを適用した。ADの生理学的状態におけるATP2B、ATP2B1それぞれの関係の複雑な概観に關与する、下側頭皮質に対する前頭皮質並びにAD患者に対する対照の両相対的プロファイリング研究を以下に詳細に示す。

#### 【0086】

1) 対照及びAD患者それぞれの側頭皮質組織及び下側頭皮質組織の間のmRNA発現の相対比較。この取り組みによって、同定した遺伝子ATP2B1が変性に対して脆弱性の低い組織 (側頭皮質) の保護に關係するのか、又は脆弱性の高い組織 (下側頭皮質) における変性過程に關係するのか、若しくは増強するのかの確認が可能になった。

50

## 【0087】

まず、ATP2B1をコードする遺伝子の特異的プライマーを用いたPCRの効率を測定するために、標準曲線を作製した。

## 【0088】

プライマーA、配列番号5、5'-GATCACGCTGAAGAAGGGAGTTG-3'及びプライマーB、配列番号6、5'-TTAGAGCCCCCTGAATGGAAC-3'。

## 【0089】

PCR増幅(95℃1秒、56℃5秒、及び72℃5秒)を、LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I mix (FastStart Taq DNAポリメラーゼ、反応緩衝液、dUTPの代わりにdUTPを含むdNTPmix、SYBR Green I色素及びMgCl<sub>2</sub> 1mM、Rocheを含有する)、プライマー0.5µM、cDNA希釈系列(最終濃度、ヒト全脳cDNA、40、20、10、5、1及び0.5ng、Clontech)2µl、及び使用したプライマーに応じて、さらにMgCl<sub>2</sub> 3mMを含有する20µl量中で実施した。融解曲線分析では、約84.3℃に単一ピークがあることが明らかで、プライマーの2量体は認められなかった。PCR産物の品質及び大きさは、DNA LabChipシステム(Agilent 2100 Bioanalyzer、Agilent Technologies)を使用して測定した。試料の電気泳動図では、ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子の予測された大きさの124bpに単一のピークが認められた。

## 【0090】

定量用の参照標準物として選択した一連の参照遺伝子のPCR効率を測定するために、類似の方法でPCRプロトコルを適用した。本発明では、このような5種の参照遺伝子の平均値を測定した。(1)サイクロフィリンB、MgCl<sub>2</sub>(3mMの代わりに1mMをさらに添加した)以外は特異的プライマー、配列番号7、5'-ACTGAAGCAC TACGGGCTTG-3'及び配列番号8、5'-AGCCGTTGGTGTCTIT TGCC-3'を使用。融解曲線分析では、約87℃に単一ピークがあることが明らかで、プライマーの2量体は認められなかった。PCR産物のアガロースゲル分析は、予測した大きさ(62bp)の1本の単一バンドを示した。(2)リボソーム蛋白質S9(RPS9)、特異的プライマー、配列番号9、5'-GGTCAAATTTACCCCTGGCCA-3'及び配列番号10、5'-TCTCATCAAGCGTCAGCAGTTTC-3'を使用(MgCl<sub>2</sub> 3mMの代わりにさらに1mMを添加した)。融解曲線分析では、約85℃に単一ピークがあることが明らかで、プライマーの2量体は認められなかった。PCR産物のアガロースゲル分析は、予測した大きさ(62bp)の1本の単一バンドを示した。(3)ベータアクチン、特異的プライマー、配列番号11、5'-TGGAAACGGTGAAGGTGACA-3'及び配列番号12、5'-GGCAAAGGGACTTCCCTGTA-3'を使用。融解曲線分析では、約87℃に単一ピークがあることが明らかで、プライマーの2量体は認められなかった。PCR産物のアガロースゲル分析は、予測した大きさ(142bp)の1本の単一バンドを示した。(4)GAPDH、特異的プライマー、配列番号13、5'-CGTCATGGGTGTGAACCATG-3'及び配列番号14、5'-GCTAAGCAGGGTGGTGCAG-3'を使用。融解曲線分析では、約83℃に単一ピークがあることが明らかで、プライマーの2量体は認められなかった。PCR産物のアガロースゲル分析は、予測した大きさ(81bp)の1本の単一バンドを示した。(5)トランスフェリン受容体TRR、特異的プライマー、配列番号15、5'-GTCGCTGGTCA GTTTCGTGATT-3'及び配列番号16、5'-AGCAGTTGGCTGTTGTACCTCTC-3'を使用。融解曲線分析では、約83℃に単一ピークがあることが明らかで、プライマーの2量体は認められなかった。PCR産物のアガロースゲル分析は、予測した大きさ(80bp)の1本の単一バンドを示した。

## 【0091】

値を計算するために、最初に cDNA 濃度の対数を ATP2B1 蛋白質をコードする遺伝子及び 5 種の参照標準遺伝子のサイクル数閾値  $C_t$  に対してプロットした。標準曲線の勾配及び切片（すなわち、直線回帰）を全遺伝子について計算した。第 2 段階で、AD 患者及び健康な対照個体の前頭皮質からの、AD 患者及び健康な対照個体の側頭皮質からの、AD 患者及び健康な対照個体の海馬からの cDNA 並びに AD 患者及び健康な対照個体の前頭皮質及び側頭皮質からの、及び AD 患者及び健康な対照個体の前頭皮質及び海馬からの cDNA それぞれを並行して分析し、シクロフィリン B に対して正規化した。 $C_t$  値を測定して、対応する標準曲線を使用して全脳 cDNA ng に変換した。

【0092】

10  $10^{((C_t \text{ 値} - \text{切片}) / \text{勾配})}$  [全脳 cDNA ng] 10  
 側頭皮質及び前頭皮質 ATP2B1 cDNA の値、海馬及び前頭皮質 ATP2B1 cDNA の値、及び AD 患者 (P) 及び対照個体 (C) の前頭皮質 ATP2B1 cDNA の値、及び AD 患者 (P) 及び対照個体 (C) の側頭皮質 ATP2B1 cDNA の値それぞれは、シクロフィリン B に対して正規化し、下式に従ってその比を計算した。

【0093】

【数 1】

$$\text{比} = \frac{\text{ATB2B1側頭 [ng]} / \text{シクロフィリンB側頭 [ng]}}{\text{ATB2B1前頭 [ng]} / \text{シクロフィリンB前頭 [ng]}}$$

20

$$\text{比} = \frac{\text{ATB2B1海馬 [ng]} / \text{シクロフィリンB海馬 [ng]}}{\text{ATB2B1前頭 [ng]} / \text{シクロフィリンB前頭 [ng]}}$$

30

$$\text{比} = \frac{\text{ATB2B1P側頭 [ng]} / \text{シクロフィリンBP側頭 [ng]}}{\text{ATB2B1C側頭 [ng]} / \text{シクロフィリンBC側頭 [ng]}}$$

40

$$\text{比} = \frac{\text{ATB2B1P前頭 [ng]} / \text{シクロフィリンBP前頭 [ng]}}{\text{ATB2B1C前頭 [ng]} / \text{シクロフィリンBC前頭 [ng]}}$$

【0094】

第 3 段階では、各個体の脳試料について参照標準遺伝子の発現レベルの、対照者に対する AD 患者の側頭皮質比、対照者に対する AD 患者の前頭皮質比、及び AD 患者及び対照者の前頭に対する側頭比及び AD 患者及び対照者の前頭に対する海馬比それぞれの平均値の測定するために、並行して一連の参照標準遺伝子を分析した。シクロフィリン B は段

50

階 2 及び段階 3 で分析され、1 遺伝子のもう 1 つの遺伝子に対する比が別の測定でも一定のままであったので、単一遺伝子のみを正規化する代わりに、一連の参照標準遺伝子の平均値に対して ATP2B1 蛋白質をコードする遺伝子の値を正規化することが可能である。この計算は、ハウスキーピング遺伝子の平均値からのサイクロフィリン B の偏差で、前記で示したそれぞれの比を除することによって、実施することができる。ATP2B1 蛋白質をコードする遺伝子のこのような定量的 RT-PCR 分析の結果を図 2、3 及び 12、13 に示す。

【0095】

2) 対照と AD 患者との間の mRNA 発現の比較。

【0096】

この分析のために、異なる時点、異なる実験間のリアルタイム定量的 PCR (Lightcycler 法) の絶対値は、標準物質を使用しない定量的比較に使用するために十分一貫性があることがわかった。100 種を上回る組織での qPCR 実験のいずれにおいても、サイクロフィリンを正規化のための標準物として使用した。その他の中でも、それは我々の正規化実験では最も一貫して発現したハウスキーピング遺伝子であることが分かった。したがって、サイクロフィリンで得られた値を使用することによって、概念の証明が実施された。

【0097】

第 1 の分析では、3 種の異なる提供者の前頭皮質及び下側頭皮質の qPCR 実験のサイクロフィリン値を使用した。各組織の同一の cDNA 調製物を分析実験全てにおいて使用した。この分析内では、データが小数であるので、値の正規分布は実現しなかった。したがって、中央値及び 98% 信頼度の方法を適用した。この分析によって、絶対値比較用の中央値では 8.7% の中程度の偏差があり、相対値比較用の中央値では 6.6% の中程度の偏差があることが明らかになった。

【0098】

第 2 の分析では、2 種の異なる提供者それぞれの前頭皮質及び下側頭皮質組織の qPCR 実験のサイクロフィリン値を使用した。様々な時点の様々な cDNA 調製物を使用した。この分析によって、絶対値比較用の中央値では 29.2% の中程度の偏差があり、相対比較用の中央値では 17.6% の中程度の偏差があることが明らかになった。この分析から、qPCR 実験の絶対値は使用することはできるが、中央値での中程度の偏差はさらに考慮すべきであると結論づけられた。ATP2B1 の絶対値の詳細な分析を実施した。したがって、ATP2B1 の絶対レベルは、サイクロフィリンによる相対的正規化の後に使用された。中央値並びに 98% 信頼度は、対照群 (Braak 0 ~ Braak 3) 及び患者群 (Braak 4 ~ Braak 6) それぞれについて計算された。同様の分析を実施して、対照群 (Braak 0 ~ Braak 2) 及び患者群 (Braak 3 ~ Braak 6) を再評価し、対照群 (Braak 0 ~ Braak 1) 及び患者群 (Braak 2 ~ Braak 6) を再評価した。後者の分析は、対照と AD 患者との間の mRNA 発現差の早期開始を確認することが目的であった。この分析を他の観点から考える場合、遺伝子発現制御の傾向並びに差の早期開始を確認するために、Braak 段階 0 ~ 1、Braak 段階 2 ~ 3 及び Braak 段階 4 ~ 5 を含む 3 種の群それぞれを互いに比較した。前述した前記分析を図 4 に示す。

【0099】

(v) 免疫組織化学

ヒト脳における ATP2B1 の免疫蛍光染色では、様々な Braak 段階のアルツハイマー病であることが臨床的に診断され、神経病理学的に裏付けられた患者並びに同じ年齢のアルツハイマーではない対照個体を含む提供者の死後の新鮮な凍結前頭及び側頭前脳標本を、クリオスタット (Leica CM3050S) を使用して厚さ 14  $\mu$ m に切断した。この組織切片を室温で空気乾燥し、アセトンで 10 分間固定した。PBS で洗浄後、この切片をブロッキング緩衝液 (正常ウマ血清 10%、Triton X-100 0.2%、TBS 溶液) で 30 分間予備インキュベートして、次に抗 ATP2B1 ヤギポリク

10

20

30

40

50

ローナル抗血清（ブロッキング緩衝液で1：8に希釈、Santa Cruz、sc-16488）で4で一晚インキュベートした。0.1% Triton X-100/PBSで3回洗浄した後、この切片をFITC結合ロバ抗ヤギIgG抗血清（Dianova、705-096-147、1%BSA/PBSで1：150に希釈）で室温で2時間インキュベートし、次いでPBSで再度洗浄した。ニューロン細胞の染色は、ニューロン特異的マーカーNeuNに対するマウスモノクローナル抗体（Chemicon、MAB377、1：200に希釈）及びCy3結合ロバ抗マウス第2抗体（Dianova、115-166-150、1：600に希釈）を使用して前述のように実施した。核染色は、この切片をPBSに溶かしたDAPI 5μMで3時間インキュベートすることによって実施した。ヒト脳におけるリポフスチンの自己蛍光を阻止するために、この切片を70%エタノールに溶かしたSudan Black B 1%で室温で2～10分間処理し、次いで70%エタノール、蒸留水及びPBSに次々と浸漬した。この切片に「Vectashield」封入剤（Vector Laboratories、Burlingame、CA）によってカバーガラスで覆った。暗視野落射蛍光及び明視野位相差照明条件を使用して顕微鏡画像を得た（IX81、Plympus Optical）。顕微鏡画像は、PCO SensiCamでデジタル撮影して、適切なソフトウェア（Analysis、Olympus Optical）（図14及び15参照）を使用して分析した。

10

#### 【図面の簡単な説明】

【0100】

20

【図1】蛍光ディファレンシャルディスプレイスクリーニングにおいて、ATP2B1蛋白質をコードする遺伝子、ATP2B1の発現差異の初期の同定を示した図である。

【図2】定量RT-PCR分析を用いたAD脳組織におけるATP2B1をコードするATP2B1遺伝子の発現差異の証拠を示した図である。

【図3】定量RT-PCR分析を用いたAD脳組織におけるATP2B1をコードするATP2B1遺伝子の発現差異の証拠を示した図である。

【図4】98%信頼度での中央値の統計学的方法を使用して、対照とAD期を比較することによって、ATP2B1の絶対的mRNA発現の分析を示した図である。

【図5】配列番号1、ATP2B蛋白質ATP2B1のアミノ酸配列を示した図である。

【図6-1】配列番号2、ゲノムデータベースmRNA及びEST（図10）から構築された、5178個のヌクレオチドを含むヒトATP2B1 cDNAのヌクレオチド配列を示した図である。

30

【図6-2】配列番号2、ゲノムデータベースmRNA及びEST（図10）から構築された、5178個のヌクレオチドを含むヒトATP2B1 cDNAのヌクレオチド配列を示した図である。

【図6-3】配列番号2、ゲノムデータベースmRNA及びEST（図10）から構築された、5178個のヌクレオチドを含むヒトATP2B1 cDNAのヌクレオチド配列を示した図である。

【図7】配列番号3、ディファレンシャルディスプレイ及びその後のクローニングによって同定され、得られたATP2B1 cDNA断片644bpのヌクレオチド配列（5'から3'方向の配列）を示した図である。

40

【図8-1】配列番号4のヌクレオチド配列、3351個のヌクレオチドを含み、配列番号2のヌクレオチド182から3712を有するヒトATP2B1遺伝子のコーディング配列（cds）を示した図である。

【図8-2】配列番号4のヌクレオチド配列、3351個のヌクレオチドを含み、配列番号2のヌクレオチド182から3712を有するヒトATP2B1遺伝子のコーディング配列（cds）を示した図である。

【図9】配列番号3の640塩基対に対するヒトATP2B1 cDNAのヌクレオチド配列、配列番号2の配列整列の概略を示した図である。

【図10】配列番号2及びゲノムデータベース配列断片からのATP2B1のコーディン

50

グ配列 ( c d s ) の整列の概略図である。

【図 1 1】 A T P 2 B 1 をコードする c D N A 配列、配列番号 2、同定された c D N A 断片配列、配列番号 3、 A T P 2 B 1 転写レベルプロファイリングに使用した両プライマー配列 ( プライマー A、プライマー B ) 及び A T P 2 B 1 のコーディング配列 ( c d s )、配列番号 4 の整列を示した概略図である。配列位置は、右側に示す。

【図 1 2】 本明細書では内部参照番号 P 0 1 0、P 0 1 1、P 0 1 2、P 0 1 4、P 0 1 6、P 0 1 7、P 0 1 9、P 0 3 8、P 0 4 0、P 0 4 1、P 0 4 2、P 0 4 6、P 0 4 7、P 0 4 8、P 0 4 9 によって識別した A D 患者 1 5 人及び本明細書では内部参照番号 C 0 0 5、C 0 0 8、C 0 1 1、C 0 1 2、C 0 1 4、C 0 2 5、C 0 2 6、C 0 2 7、C 0 2 9、C 0 3 0、C 0 3 1、C 0 3 2、C 0 3 3、C 0 3 4、C 0 3 5、C 0 3 6、C 0 3 8、C 0 3 9、C 0 4 1、C 0 4 2、D E 0 2、D E 0 3、D E 0 5、D E 0 7 で識別した同じ年齢の対照固体 2 5 人の前頭皮質に対する側頭皮質における A T P 2 B 1 遺伝子発現レベルを示した図である。

10

【図 1 3】 本明細書では内部参照番号 P 0 1 0、P 0 1 1、P 0 1 2、P 0 1 4、P 0 1 6、P 0 1 9 ( 0 . 1 6 から 0 . 7 0 倍 ) で識別した A D 患者 6 人及び本明細書では内部参照番号 C 0 0 4、C 0 0 8 ( 0 . 5 8 から 0 . 8 0 倍 ) で識別した健康な、同じ年齢の対照固体 2 人の、 A T P 2 B 1 をコードする A T P 2 B 遺伝子について、前頭皮質に対する海馬での遺伝子発現レベルを示した図である。

【図 1 4】 ヤギポリクローナル抗 A T P 2 B 1 ( 抗 P M C A 1 ) 抗血清 ( 緑色のシグナル ) ( 拡大率 1 0 × ) で免疫標識した対照供与者 ( 対照 T ) 及びアルツハイマー患者 ( 患者 T ) の下側頭回の画分でデジタル撮影した顕微鏡写真を例示した図である ( 倍率 1 0 × )

20

【図 1 5】 ヤギポリクローナル抗 A T P 2 B 1 ( 抗 P M C A 1 ) 抗血清 ( 緑色のシグナル ) で免疫標識した対照提供者 ( 対照 F ) 及びアルツハイマー患者 ( 患者 F ) の前頭皮質の画分からデジタル撮影した顕微鏡写真を例示した図である ( 倍率 1 0 × ) 。

【図 1】

【図 2】

Fig. 1: 蛍光ディフアレンシャルディスプレイスクリーンにおいて差異的に発現した遺伝子の同定

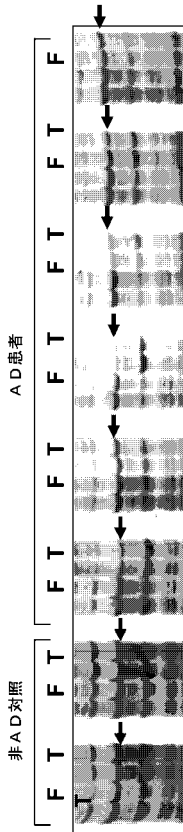
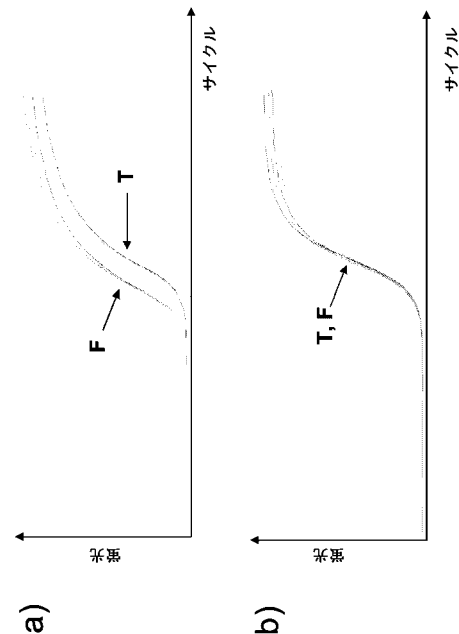
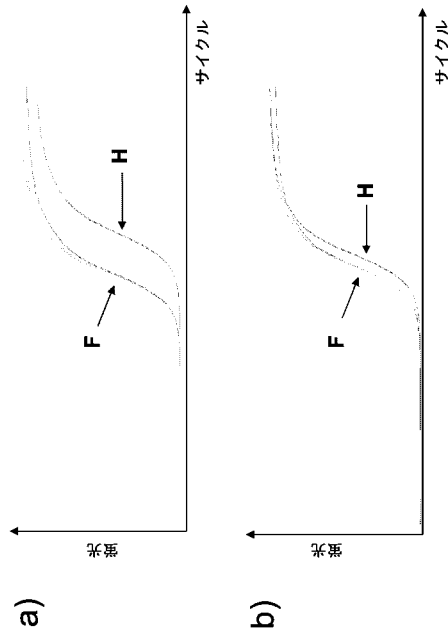


Fig. 2: 定量PCRによるATP2B1の発現差異の証明



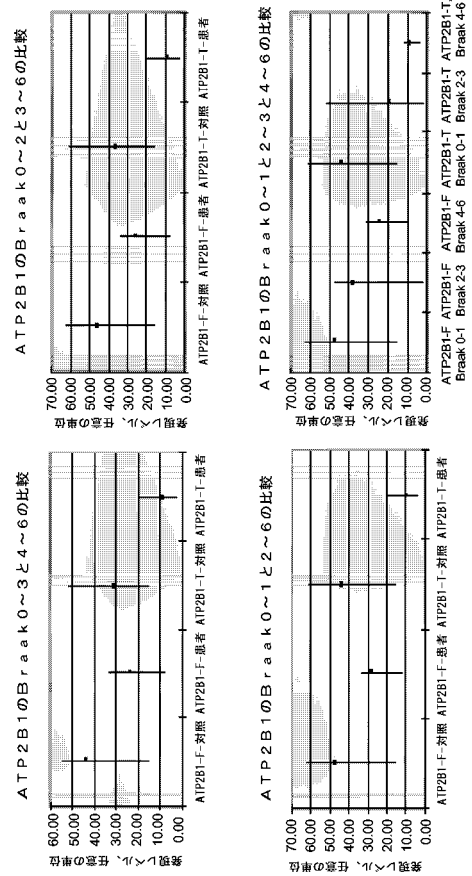
【 図 3 】

Fig. 3: 定量PCRによるATP2B1の発現差異の証明



【 図 4 】

Fig. 4: ATP2B1のmRNA発現絶対値の分析



【 図 5 】

Fig. 5: 配列番号 : 1 ; ヒトATP2B1蛋白質のアミノ酸配列

長さ : 1176aa

```

1  MGDMANNSVA YSGVKNLSKE ANHDGDFGIT LAELRALMEL RSTDALRKIQ
51  ESYGDVYIGIC TKLKTSPNEG LSGNPADLER REAVPGKNEI PPKPKTFLQ
101 LVWEALQDVT LILIEIAAIV SLGLSFYQPP EGONALCGEV SVGEEEGEGE
151 TGIWEGAAIL LSVGVVVLVT AFNDWSKEQK FRGLQSRIEQ EQKPTVIRGG
201 OVIQIPVADI TVGDIAQVRY GDLLPADGIL IQGNLDKIDE SSLTGESDHY
251 KKSIDRDPDL LSGTHVMEGS GRMVVTAVGV NSQTGILFTL LGAGGEEBEEK
301 KDEKKEKEM KRQDGAIENR NKAKAQDGA MEMQPLKSEE GGDGDEKDKK
351 KANLPKKEKS VLQGLTKLA VQIKAGLLM SAITVILLVL YFVIDTFWVQ
401 KRPELAECTP IYIQVFVKEF IIGVTVLVVA VPEGLPLAVT ISLAYSVKKM
451 MKDNILVRHL DACETMGNAT AICSDKTCTL TMNRMTVVQA YINEKHYKVV
501 PEPEAIPFNI LSYLVGTISV NCAVTSKILP PEKEGGLPRH VGNKTECALL
551 GLLLDLKRKY QDVNRNIEPE ALYKVTENS VRKSMSTVLK NSDGSYRIFS
601 KGASEIILKK CFKILSANGE AKRFRPRDRD DIVKTVIEPM ASEGLRTICL
651 AFRDFPAGEP EPEWDNENDI VTGLTCIAVV GIEDPVRPEV PDAIKKQORA
701 GIVRVMVTDG NINTARAIAT KCGILHPGED FLCLEGKDFN RRRINEKGEI
751 EQERIDKIWF KLRVLRASSP TDKHTLVKGI IDSTVSDQRQ VVAVTGDGTN
801 DGPALKKADV GFAMGIAGTD VAKEASDIIL TDDNFTSIVK AVMWGRNVYD
851 SISKFLQFQL TVNVVAVIVA FTGACITQDS PLKAVQMLVW NLIMDTLASL
901 ALATEPPPTES LLLRKYGRN KPLISRTMMK NILGHAFYQL VVVFTLLFAG
1701 CACCAAAATAT TTTGTCCATAT CTTGTAACGT GAATTTCTGT GAATTTGGCT
1751 TATACATCAA AAATATTTGCC ACCAGAGAAA GAGGTTGGAT TACCTCGTCA
1801 CGTTGGTAAAT AAAACTGAAT GTGCCCTTGT GGGACTTCTT TTTGATTTAA
1851 AACGGGATTA TCAGGATGTT AGAAATGAAA TACCAGAAGA AGCATGTGAT
1901 AAAGTCTACA CCTTCAACTC TGTTAGGAAG TCCATGAGTA CTGCTCTGAA
1951 AAATTCAGAT GGAAGTTATC GAATATTTCAG CAAGGTTGCA TCTGAGATAA
2001 TTCTGAAAAA GTGTTTCAA AATCTGAGCT CTAATGGTGA GGCAAAAGTA
2051 TTCAGACCAA GGGACCTGTA TGATATTGTA AAAACTGTGA TTGAACCCAG
2101 GGCATCAGAA GGCTTGAGAA CCATATGTCT TGCATTGAGA GATTTTCCAG
2151 CAGGAGAACC AGAACCCAGG TGGGATAATG AAAATGATAT TGTCAACGGG
2201 CTTACATGCA TTGCTGTTGT GGGGATGAAA GATCCTGTGA CCCTGATGCT
2251 GCCAGATGCA ATTAATAAAGT GTCAGAGGGC TGGAAATFAC GTCCGGATGG
2301 TCACTGGTGA TAATATTAAT ACTGCTCGGG CCATCTCTAC CAAATGTGTT

```

【 図 6 - 1 】

Fig. 6: 配列番号 : 2 ; ヒトATP2B1 cDNAのヌクレオチド配列

長さ : 5178bp

```

1  GGCCAAAGGT CAAGATACTT CTCTGGGAAA TGTTCGTGCT GATGCTGCTT
51  TACAAGTCA TACAATGAGT GTTTGGTTTA AGAAAGATT TCACTACTAA
101 AAGATTTTCA TCTTGGAAAT ACATCAAGTG AAAATTAAT TCTTTTGGGA
151 AACATTTTCC TTCTGATATA TTACTTGTGT AATGGCCGAC ATGGCAAAACA
201 ACTCAGTTCG TTACACTGGT GTGAAAACCT CTTTGAAGGA AGCTAATCTG
251 GATGGAGACT TTGGAATTAC GCTCCGACAG CTGCGGGCTC TCAATGAGCT
301 CAGGTCCACA GATGCATTAC GAAAATACA GGAAGCTAT GGAGATGCT
351 ATGGAAATTTG CACCAAATTTG AAAACATCTC CCAATGAAGG TTTAAGTGGGA
401 AACCTTCGAG ATTTAGAAAG AAGAGAAGCA GTGTTTGGAA AGAATTTTTAT
451 ACCTCCTAAA AAGCCAAAAA CCTTTCTTCA ATTAGTAGTG GAAGCATTAC
501 AAGATGTCAC TTTAATTTATA TTGAAATTTG CAGCCATAGT ATCATTGGGC
551 CTTTCTTTTT ATCAGCCTCC AGAAGGGGAT AATGCATTTT GTGGAGAAGT
601 TTCTGTTGGG GAGGAAGAAG GTGAAGGTGA AACTGTTGG ATTTGAAGGAG
651 CTGCAATCCT CTGCTCTGTA GTGTGTGTTG TCTTAGTAAC AGCTTTCAAT
701 GACTGGAGTA AGGAAAAACA GTTTAGAGGT TTGCAGAGCC GAATTTGAACA
751 AGAACACAGA TCACTCTGCA TCAGGGGTGG TCAGGTCATT CAGATACCTG
801 TAGCTGACAT TACTGTTGGA GATATTGCTC AAGTGAATA TGGTGTACTT
851 CTTCCAGCTG ACGGCATACT TATTCAGGCC AACGATCTCA AAATTTGATGA
901 AAGCTCATGT ACTGGTGAAT CAGATCATGT TAAAAAGTCT TTGATAAAGG
951 ATCCCTTACT TCTATCAGGT ACTCATGTA TGGAAGGCTC TGGAAAGATG
1001 GTAGTTACAG CTGTAGGTGT AAATTTCAA ACTGGAATTA TCTTTACCCT
1051 ACTTTGAGCT GGAGGTGAAG AGGAAGAGAA GAAAGATGAG AAGAAAAAGG
1101 AAAAGAAAAA TAAGAAACAA GATGGAGCTA TTGAGATTCG CAACAAGGA
1151 AAAGCCAGAG ATGGTGCAGC CATGGAATG CAGCCATTGA AGAGTGAAGA
1201 AGGTGGAGAT GGTGATGAAA AAGATAAAA GAAAGCAAT TTGCCAAAAA
1251 AGGAAAAAAT TGTTTTACAA GGAACATTA CAAACTGGC TGTTCAGATT
1301 GGCAAGACAG GTCTGTTGAT GTCTGGCATC ACAGTTATCA TTTAGTATT
1351 ATATTTTCTC ATTGCACCTT CTTGGCTTCA GAAAGACCCA TGCTTGGCTG
1401 AGTGACACCC AATTTATATA CAATACTTTT TGAAGTTCTT CATTATTGGA
1451 GTTACAGTTT TAGTGTCCGC ACTGCCAAA GCTCTCCAC TGCAGCTCAC
1501 GATCTCACTG GCTTATTCAG TCAAAAAAT GATGAAAGAT AATAACTTAG
1551 TAAGGCATCT GGATGCTTGT GAAACCATGG GAAATGCTAC AGCTATTTGT
1601 TCAGATAAAA CAGGAACCTT GACAAATGAA AGAATGACAG TGTTCAGAGC
1651 TTACATAAAT GAAAAACATT ATAAAAAGGT TCTTGAACCA GAAGCTATTTC
1701 CACCAAAATAT TTTGTCCATAT CTTGTAACGT GAATTTCTGT GAATTTGGCT
1751 TATACATCAA AAATATTTGCC ACCAGAGAAA GAGGTTGGAT TACCTCGTCA
1801 CGTTGGTAAAT AAAACTGAAT GTGCCCTTGT GGGACTTCTT TTTGATTTAA
1851 AACGGGATTA TCAGGATGTT AGAAATGAAA TACCAGAAGA AGCATGTGAT
1901 AAAGTCTACA CCTTCAACTC TGTTAGGAAG TCCATGAGTA CTGCTCTGAA
1951 AAATTCAGAT GGAAGTTATC GAATATTTCAG CAAGGTTGCA TCTGAGATAA
2001 TTCTGAAAAA GTGTTTCAA AATCTGAGCT CTAATGGTGA GGCAAAAGTA
2051 TTCAGACCAA GGGACCTGTA TGATATTGTA AAAACTGTGA TTGAACCCAG
2101 GGCATCAGAA GGCTTGAGAA CCATATGTCT TGCATTGAGA GATTTTCCAG
2151 CAGGAGAACC AGAACCCAGG TGGGATAATG AAAATGATAT TGTCAACGGG
2201 CTTACATGCA TTGCTGTTGT GGGGATGAAA GATCCTGTGA CCCTGATGCT
2251 GCCAGATGCA ATTAATAAAGT GTCAGAGGGC TGGAAATFAC GTCCGGATGG
2301 TCACTGGTGA TAATATTAAT ACTGCTCGGG CCATCTCTAC CAAATGTGTT

```

【 図 6 - 2 】

2351 ATTTTACATC CTGGGGAAGA TTTTCTGTGC CTAGAAGTA AAGATTTTAA
2401 CAGAAAGATA CAAATGAAA AAGGAGAGAT TGAGCAAGAG AGGATAGACA
2451 AGATTTGGCC AAAACTGGCA GTACTTGCAG GATCATCTCC TACTGATAAG
2501 CATACACTGG TAAAGGTAT AATTGACAGC ACTGTCTCCG ACCAACGCCA
2551 GGTGTAGCT GTAACCTGGT ATGGTACAAA TGATGCCCA GCACATAAGA
2601 AAGCAGATGT TSGATTTGCA ATGGGTATTT CTGGAACGTA TGATGCTAAA
2651 GAAGCATCCG ATATTATCTT CACAGATGAC AACTTTACAA GCATTTTAA
2701 AGCAGTTATG TGGGGACGAA ATGTCATATG CAGCATCTCA AAATTCCTTC
2751 AGTTCCAACT TACTGTATAT GTAGTAGCAG TGATTTGTTC TTTTACGGGC
2801 GCCTGCATTA CTCAGACTC ACCGCTTAAG GCTGTGCAGA TGCTGTGGGT
2851 AAACCTCATA ATGATAACAC TCGCTTCCCT GGCTCTGGCA ACCGAACCAC
2901 CCACTGAGTC TCTCTTCTT CCGAAACCTT ATGGTAGAAA TAAGCCTCTC
2951 ATCTCAAGTA CAATGATGAA GAATATTTTG GGTCATGCAT TCTATCAACT
3001 TGTAGTAGTC TTTACACTCT TATTTCTGGG AGAAAAGTTT TTTGACATTT
3051 ATAGTGAAG AAATGCTCTT TTGCATGCTC CTCTCTCAGA ACATATATCT
3101 ATTTTTTTAA TACTCTTTGT GCTGATGCAG CTTTTCAAGC AAATAAATGC
3151 CCGGAAAATT CATGGTGAAG GAATTTTATT CGAAGGAATC TTTAACAATG
3201 CCATCTCTCG CACAATTTGT TTAGGCACTT TTGTGGTACA GATAATAATT
3251 GTGCAGTTTG GTGGAAGAAC TTTCACTTTT TCAGAACTTT CAATAGAACA
3301 GTGCATATGG TCAATATCTC TAGGAATGGG AACATTACTC TGGGGCCAGC
3351 TTTATTTCAA AATTTCAAAT AGCGGTTTAA AATTCCTCAA AGAAGCTGGT
3401 CATGGAACAC AAAGGAAGA AATACCTGAG GAGGAATTAG CAGAGAGATG
3451 TGAAGAGATT GATCAGCGTG AAAGGGAGTT GCGGGCTGGC CAAATCTTGT
3501 GGTTTAGAGT TCTGAACAGA ATCCAAACAC AGATGGATGT AGTGAATGCT
3551 TTCCAGAGTG GAAGTTCATC TCAGGGGGCT CTAAAGCCGC ACACCTCCAT
3601 CGCCAGCCAG CATCATATGT TAACAATAAT TTCTACCCCT ACACATGTAG
3651 TGTTTTCCCT TCTACTGCT TCTACTACTG TGGGGTATCT GAGTGGTAAA
3701 TGCATTTTGT AGTCTTTTAT ATGAAGGTTT AGAAAACCG GAATCAAGAA
3751 GTTCGATTTA CAATTTTATG ACATCTCTG AGTTTAGGAT AGAAGATTCA
3801 GAGCCTCATA TCCCCCTTAT TGATGACACT GATGCCGAAG ATGATGCTCC
3851 TACAAAAGCT AACTCCAGTC CTCACCCCTC TCCCAACAAA AATAACAATG
3901 CTGTTGACAG TGGATTCAC CTTACAATAG AATGAACAA CTCTCTGATC
3951 TCTTCAATCC CAGGAAGCCC ACTCATATG TTGGAACAT CACTCTGAT
4001 GTAAGCTGAA TCTTAACACA CTAGCTGCAT TGTAAAGAAA CAATTTGAAA
4051 CTGGCTTCTT TCACATATG TCATGGACAA GCTACTATTC TTCTCTTTCG
4101 ACTTCAACAG AAGACACACT TGTACGAATG TAGATTTAT TTTTAAAAA
4151 AAAAAAGCA AAGCTTTCTG CCAGACTGAG GPTGCTTTTT GGGGGTGGG
4201 AGAAATGAAC TGACAGATAA ACAGTAAGTC AGCGTAAGTG ACCTGTGGAT
4251 CATCAGTAGT ACCCAAGCAT GGTCTGGAAC AGTGTATTAG CAGAGCTTTA
4301 GTTTAATCTA GTCTTGGATG GGAGAGAGAG GGAGGATGAA AACTGGGCAA
4351 GACAAAGAGC CCTGGATCGT TGAATTTGATA GTTTAATTTT TGCTGTGGC
4401 TGTAAATAAT TTGGATTTAT TATGTTTATA AATGATACAG ATCTGTTTAC
4451 AAGGTTTGTG GATACTTTTT TTGTCTCTGT TCATAGATGG GAGCTTCTC
4501 TATAACTGAT GCAGAGAAAA ATTAGCTCTT CAAACTCTGC TGTATTTTCA
4551 GGAAAAAATA AAAAAAGGGT GTTTCTATTG AAACCTACTT AAATTTTTGC
4601 CTACAATTTA CCTTGTAAA TATTTAGAT AAATGCTAAA TACTAATAGC
4651 CAAATAGATA AACTAATGCT TTTGTTTAAA AAAAAAGAAA AAAAAACA
4701 AAAAAAATA ACATGAGCAG TGGTGTCTA ATGAAGTTAT GACATCTGTC
4751 CTAATTAGTT TCTAATAATC ATTTACTACT TAATGTTTTT GAAGCAACTC
4801 TTTAATTTTT AAAATTTTTT AAAACTGCT AATAACCTTT TGTTCAGAA
4851 TTAGTAGATT GTTTAATGCA GGACATCAAC TACATAATGA AAGATGCTTG
4901 AAATGCTTTT GTTATTTGAG GCAAAATCAA TTAATCAGAA CTATCAAACT
4951 ACAAGAGAAC CTTAGTCTTT TTTGTTTTTG TCTAAACATG TTAGTTTATG
5001 GATGCTTGG TGAACGTGTA GTGAACGTTA TTGATTTTTC TAATCTTTAG

【 図 6 - 3 】

5051 AGACCTTCAC ACAGCATGAG GGCTGTGGC ATTTGAAAA AGGTTAATAA
5101 GTAGAAGCAT ACATGTTTTT CTTTGGTTTT TGAACCTGT TTGTAACAT
5151 AAATAAATAT GCCCTTTTAT TAAATAAA

【 図 7 】

Fig. 7: 配列番号 : 3

長さ : 644 bp

1 CGAGTTTAGA GGTCTGAACA GAATCCAAAC ACAGATGGAT GTAGTGAATG
51 CTTTCCAGAG TGGAGTTTCC ATTCAGGGGG CTCTAAGGGC GCACCCCTCC
101 ATGCCGACCC AGCATCATGA TGTAAACAAAT ATTTCTACCC CTACACATGT
151 AGTGTTTTCC TCTTCTACTG CTCTACTACT TGTGGGATTC GAGTGGTGAA
201 TGCAATTCGT AGTTCTTTAT ATGAAGGGTT AGAAAAACCG GAATCAAGAA
251 GTTCGATTTA CAACTTTATG ACACATCTGT AGTTTAGATG AGAAGATTCA
301 GAGCCTCATA TCCCCCTTAT TGATGACACT GATGCCGAAG ATGATGCTCC
351 TACAAAACGT AACTCCAGTC CTCGCCCTTC TCCCAACAAA AATAACAATG
401 CTGTGACAG TGGAATTCAC CTTACAATAG AATGAACAA CTCTCTGATC
451 TTTCTATCCC CAGGAAGCCC ACTCATATG TTGGAACAT CACTCTGAT
501 GTAGGCTGAA TGTAAACACA CTAGCTGCAT TGTAAAGAAA CAATTTGAAA
551 CTGGCTTCTT TCACATATG TCATGGACAA GCTACTATTC TTCTCTTTCG
601 ACTTCAACAG AAGAACACCT TMTCGAATG AGATTTATTT TTTT

【 図 8 - 1 】

Fig. 8: 配列番号 : 4. ヒト ATP2B1 コーディング配列のヌクレオチド配列

長さ : 3531 bp

1 ATGGGGGACA TGGCAAAACA CTAACCTGCT TGAAGTGGT TGAAAAATCC
51 TTTGAAAGAA GCTAATCATG ATGAGAACTT TGAATTAGC CTGCGAAGC
101 TGGGGCTCT CATGAGCTC AGTCCACAGT AGCTGATCA AAAAATACAG
151 GAAGGCTATG GAGATGCTCA TGAATTTTG ACCAATGTA AAGCATCTCC
201 CAGTAKGTT TTAGTGAGAA AGCTTGAGA TTGGAAGA AAGAGCGAAG
251 TGTFTGAAA GAATTTTATA CCTCTMAAA AGCCAAAAC CCTTCTCAA
301 TTAGTATGG AAGCATTTCA AGATGCACT TAAATATAT TGAATAATCC
351 AGCCATGTA TCAATGGGCT TTCTTTTAA TACGGCCCA GAAAGGSHA
401 ATCCACTTTG TGAAGATTTT TCTTGGGG AGSAGNAG TGAAGTGA
451 ACTGGTTGGA TGAAGAGAG TGCATCTCT TTGTCTGAG TGTCTGTGT
501 CTTAGTAACA GCTTTCAATC ACTGAGTAA GGAAAGAAC TTGAGAGGTT
551 TGGGAGGCT ATGAGACAA GACAGAGAT TACGCTGTT CAGGGTGGT
601 CAGGTCATTC AGATACCTGT AGCTGACTT ACTGTGGAG ATATTGCTCA
651 AGTGAATAT GGTGATCTC TTCACTGTA GCGCAACTT ATTCAGGCA
701 AGATCTTAA AATTTAGAA ACTCATGTA CTGGCAATC AGTCAATTT
751 AAAAAATCT TAGATAAGG TCCCTACTT CTATCAGTA CTGATGTAAT
801 GGAAGCTCT GGAAGATGG TAGTTACAG TGTAGTSTA AATTTCAA
851 CTGAAATAT CTTTACTTTA CTGAGACTT GAGTGAAGA GGAAGAAAG
901 AAGATGACA AAGAAAGGA AAGAAATAT AAGAAAGAG ATGAGCTAT
951 TGAAGTCCG AACAAAGCA AAGCCAGGA TGGTGCAGC ATGGAATGC
1001 AGCATTGAA GACTAAGAA GGTGAGATG GTGATGAAA AGATAAAG
1051 AAGAAATAT TGGCAAAA GGAAGACTT GTTTTCAAG GGAACATTC
1101 AAAACTGGCT GTTCAAGTTC GAAAGAGC TCTCTGATG TCTGCCATCA
1151 CAGTATCAT TCTAGTATA TATTTGTA TTAGACCTT CTGGGTTGAG
1201 AAAAGCAAT GGTCTGCTGA GTGACACCA ATTTATATC AATCTTTGT
1251 GAATTTCTC ATATTTGAG TTAGATGTT AGTGGTACA CTTCCAGAG
1301 GTCTTCACT TGCATCAGC ATCTCACTG CTATTCAGT CAARAATATG
1351 ATGAAGATA ATACTTATG AAGGACTCT GATGCTTGT AAGCATGGG
1401 AATGCTACA GATTTTCTT CAGTAAGAT AGACTCTGT ACATAGACA
1451 GAATGCAAT GCTTCAAGT TACATAAGT AAAAGATTA TAAAAGGTT
1501 CTTGAACAG AAGTATCTC ACCAAATAT TTTCTTATC TTGAAACAG
1551 AATTTCTGT AATTTGCTT ATAGATCAA AATATGCCA CAGAGAAAG
1601 AGGATGAT ACTCTGAC CTGGTATA AAGTGAAT TCTCTTTTG
1651 GGACTTCTT TGGATTTAA ACCGATAT CAGGATGTA GAATCAAA
1701 ACCAAGAAA GCATGTCAG AATGCTACG CTCTACTCT GTAGAGAGT
1751 CAGATGATG TGTCTGAAA AATGATGAT GAGTATGCT AATATTCAG
1801 AAGGCTGAT CTAAGATAA TCTGAAAAG TGTTCAAA TCTTGAATG
1851 TAATGTTGAG CAANAATAT TCAAGCAAG GGACCGTAT GATATTTATA
1901 AATCTGATG TGAACGATG GCATCAGAG CTTTGAAC CATATCTTT
1951 GATTTGAG ATTTTCCAG AGAAGACCA GATCAGAT GGAATATGA
2001 AATGATAT GTCAAGGCT TACATGAT TGTGTTTGT GGGATTTGAG
2051 ATCTGTTGAG ACTGAGGTT CAGATGCAA TTAAGAAATG TCAAGAGGCT
2101 GAATTTACTG TGGGATGCT CAGTGTAT AATATATA CTTCCAGAG
2151 CATTGCTACC AATGTTGTA TTTTACTC TGGGAGATG TTTCTGCTC
2201 TGAAGGATA AGATTTTAA AGAAGATAC GAAATGAAA AGGAGATTT
2251 GAGCAGAAA GATATGAAA GATTTGCCA AACTTGGAG TACTTCAAG
2301 ATGATCTCT ATGATGAGC ATGATGCTT TAAAGGATA ATGACAGCA
2351 CTCTCTGAG CCAAGCCAG GTTGTAGCTG TAACTGGTGA TGTACAAAT
2401 GATGCTGAG CACTAAGAA AGCAGTGTG GATTTGCAA TGGATTTTC
2451 TGAATCTAT GTAGTAAAG AAGCATGTA TATTTCTC ACAGATGCA
2501 ACTTCAAG CATTTTAAA GAGTATGTT GGGCAACAA TGTCTGAC

【 図 8 - 2 】

2551 AGCATCTCAA AATTCCTTCA GTTCCAACTT ACTGTTAATG TAGTAGCATG
2601 GATTTGTGCT TTTACGGGGC CTTGCAATAC TCAAGACTCA CCGCTTAAGG
2651 CTGTGCAGAT GCTGTGGGTA AACTCATAA TGGATACACT GCTTTCCTTG
2701 GCTCTGGCAA CGGAACCACC CACTGAGTCT CTCTTGTCTC GGAACCTTA
2751 TGTAGAAAAT AAGCCTTCA TCTCAGTAC AATGATGAG AATATTTTGG
2801 GTCATGCAAT CTATCAACTT GTAGTAGTCT TTAACACTCT ATTTGCTGGA
2851 GAAAAGTTTT TTGACATTTA TAGTGGAGA AATGCTCTT TCGATGGCCC
2901 TCTTCAAGAA CATTATATA TTGTTTTTAA TACCTTTGTG CTAGTGAAC
2951 TTTTCAACGA AATAAATGCC CCGAAAATTC ATGGTGAAG AATGTATTC
3001 GAAGGATCTT TTAACAATGC CATCTTCTGC ACAATGTTT TTAGCACTTT
3051 TGTGTACAG ATAATAATGG TGCAGTTTGG TGGAAAACCT TTAGCTTTT
3101 CAGAACTTTC AATAGAAGAG TGGCTATGTT CAATATTTCT AGGAATGGGA
3151 ACATTAATCT GGGGCCAGCT TATTTCAACA ATTTCAACTA GCGTTTAAA
3201 ATTTCTCAA GAACCTGCTC ATGGACACA AAGGAGAA ATACCTGAGG
3251 AAGGATTAG AGAGGATTTT GAAGGATTTT ATCAGCTGTA AAGGATTTG
3301 CCGCTGGCC AAATCTTGTG GTTTAGAGT CTGAACAGA TCCAAACACA
3351 GATGATGTA GTGATGCTT TCCAGAGTGG AATGCTCAT CAGGGGGCTC
3401 TAGGGCCGCA ACCCTCCATC CCGCAGCAGC ATCATGATG AACAAATATT
3451 TTAGCCCTTA CACATGATG GTTTTCTCT TCTACTGCT CTACTACTGT
3501 GGGGATTCG ACTGGTGAAT GCATTTCTA G

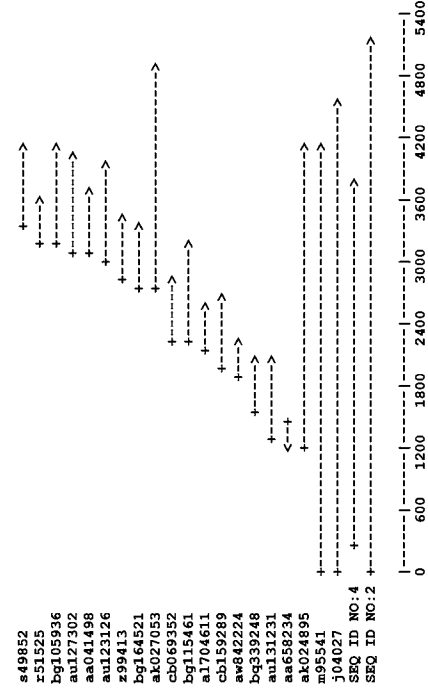
【 図 9 】

Fig. 9: 配列番号：3とヒトATP2B1 cDNAとの整合



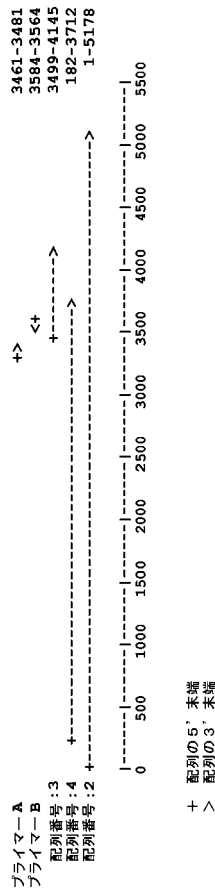
【 図 10 】

Fig. 10: 配列番号：2及びATP2B1 c d s、配列番号：4とゲノムデータベースEST-クラスター及びmRNAの整合の概略



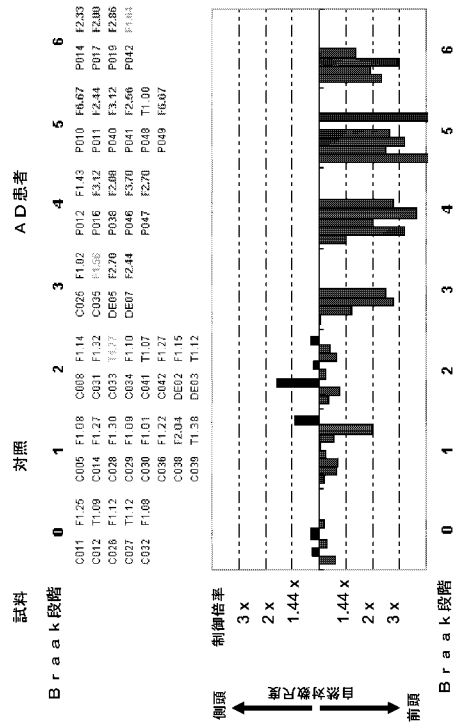
【 図 11 】

Fig. 11: 配列番号：2、配列番号：3、コーディング配列及びATP2B1のRT-PCRプライマー配列の概略



【 図 12 】

Fig. 12:



【 図 1 3 】

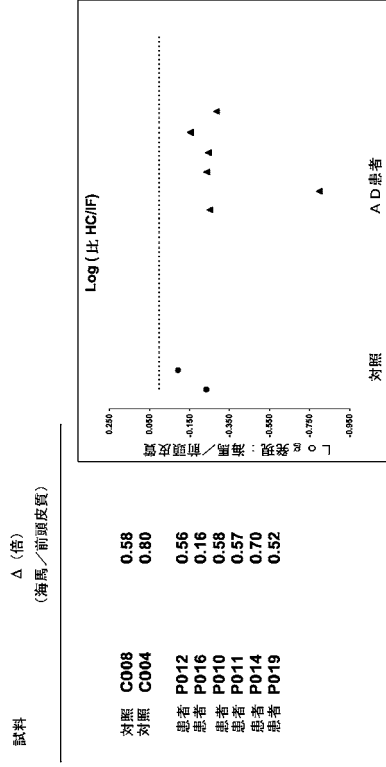
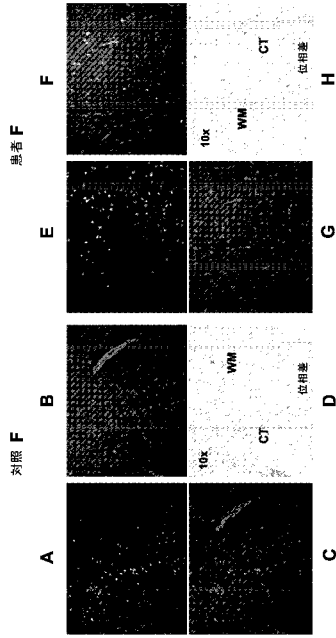


Fig. 13:

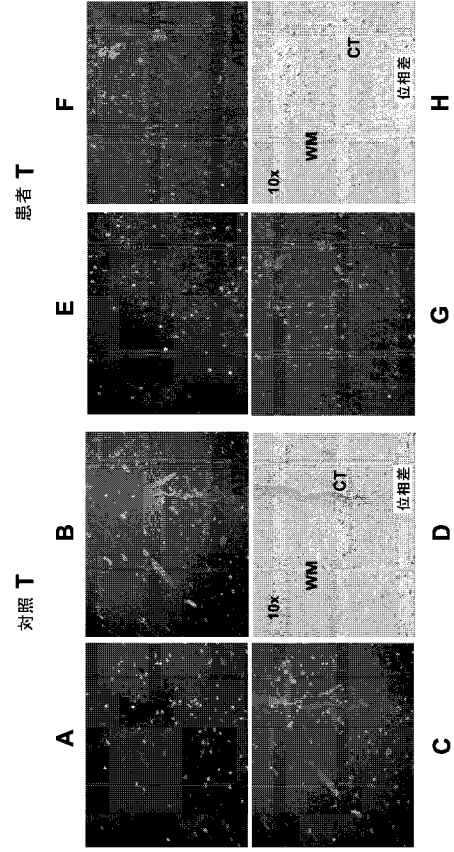
【 図 1 5 】

Fig. 15: 抗A TP 2 B 1抗血清及びDAPIで標識したヒト脳切片の画像



【 図 1 4 】

Fig. 14: 抗A TP 2 B 1抗血清及びDAPIで標識したヒト脳切片の画像



【配列表】

2008508893000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/053896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/68 C12N15/85 A61K49/00 C12Q1/68		
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) G01N C12N 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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OKUNADE GBOLAHAN W ET AL: "Targeted ablation of plasma membrane Ca <sup>2+</sup> -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 279, no. 32, 3 June 2004 (2004-06-03), pages 33742-33750, XP002363283 ISSN: 0021-9258	3,4
Y	page 19718 - page 19724; figures 2,3,5,7 the whole document ----- -/--	5-11
<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		*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	Date of mailing of the international search report	
19 January 2006	02/02/2006	
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  Seranski, P	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/053896

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HILFIKER HELENE ET AL: "Structure of the gene encoding the human plasma membrane calcium pump isoform 1" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 26, 1993, pages 19717-19725, XP002363284 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document -----	5-11
Y	POST STEPHEN G: "Future scenarios for the prevention and delay of Alzheimer disease onset in high-risk groups: An ethical perspective" AMERICAN JOURNAL OF PREVENTIVE MEDICINE, vol. 16, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 105-110, XP002363285 ISSN: 0749-3797 the whole document -----	5-11
A	RONQUIST G ET AL: "Imbalance of plasma membrane ion leak and pump relationship as a new aetiological basis of certain disease states." JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE, vol. 254, no. 6, December 2003 (2003-12), pages 517-526, XP002363286 ISSN: 0954-6820 the whole document -----	1-11
A	ZACHARIAS DAVID A ET AL: "MRNA expression of the four isoforms of the human plasma membrane Ca-2+-ATPase in the human hippocampus" MOLECULAR BRAIN RESEARCH, vol. 45, no. 1, 1997, pages 173-176, XP002363287 ISSN: 0169-328X the whole document -----	1-11

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	M
<b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50	Z
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/15	Z
<b>A 6 1 K 38/46 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/54	
<b>A 6 1 P 25/28 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/28	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72) 発明者 フォン・デア・カンマー, ハイנטツ

ドイツ国、2 2 6 0 7・ハンブルク、フエアピンドウングスシュトラッセ・6・デー

(72) 発明者 ポールナー, ヨハネス

ドイツ国、2 2 1 7 5・ハンブルク、クビツテンベーク・1 1

F ターム(参考) 2G045 AA40

4B024 AA01 AA11 CA01 CA04 CA12 CA20 DA03 HA08 HA11

4B063 QA01 QA07 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR14 QR42 QR57

QR62 QS25 QS36 QX02

4C084 AA02 BA44 DC22 NA14 ZA162

专利名称(译)	质膜ATP酶的诊断和治疗用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008508893A</a>	公开(公告)日	2008-03-27
申请号	JP2007525296	申请日	2005-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	埃沃哲欧元六合门科学的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	Ebotetsuku两欧元的科学选通EM根据她的		
[标]发明人	フォンデアカンマーハインツ ポールナーヨハネス		
发明人	フォン・デア・カンマー,ハインツ ポールナー,ヨハネス		
IPC分类号	C12Q1/34 A01K67/027 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 A61K38/46 A61P25/28 A61P43/00		
CPC分类号	A61P25/28 A61P43/00 G01N33/6896 G01N2333/914 G01N2500/04 G01N2800/2821		
FI分类号	C12Q1/34.ZNA A01K67/027 C12N15/00.A C12Q1/68.A C12Q1/02 G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K37/54 A61P25/28 A61P43/00.111		
F-TERM分类号	2G045/AA40 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR42 4B063/QR57 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/DC22 4C084/NA14 4C084/ZA162		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	60/600379 2004-08-11 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了由ATP2B基因编码的蛋白质，并公开了在阿尔茨海默氏病患者的特定脑区域中编码ATP2B蛋白质的基因的差异表达。基于该发现，本发明提供了一种用于诊断或预后受试者中的阿尔茨海默氏病，或用于确定受试者是否罹患阿尔茨海默氏病的风险增加的方法。此外，本发明提供了使用ATP2B基因及其相应的基因产物来治疗或预防阿尔茨海默氏病和相关的神经退行性疾病的治疗和预防方法。还公开了筛选神经退行性疾病的调节剂的方法。

Fig. 1. 遺伝子/プロミナーター/スクリュー-モチーフを構築的に発見した遺伝子同定

