

(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2008-544242
(P2008-544242A)

(43) 公表日 平成20年12月4日(2008.12.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	
	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2008-516347 (P2008-516347)
 (86) (22) 出願日 平成18年5月17日 (2006. 5. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年2月12日 (2008. 2. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/ES2006/000255
 (87) 国際公開番号 W02006/134185
 (87) 国際公開日 平成18年12月21日 (2006. 12. 21)
 (31) 優先権主張番号 P200501469
 (32) 優先日 平成17年6月16日 (2005. 6. 16)
 (33) 優先権主張国 スペイン (ES)

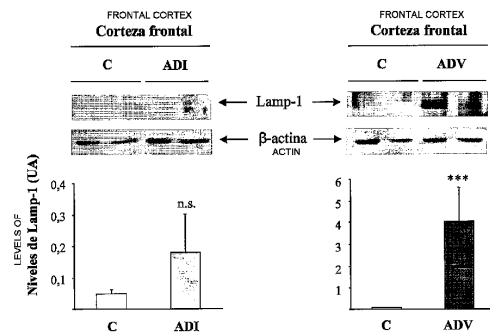
(71) 出願人 507412069
 フィナ バイオテック ソシエダ リミタ
 ダ ユニパーソナル
 スペイン マドリッド ポスエロ デ ア
 ラルコン エディフィシオ 1 カミノ
 デ ラス ウェルタス ヌメロ 2
 (74) 代理人 100075258
 弁理士 吉田 研二
 (74) 代理人 100096976
 弁理士 石田 純
 (72) 発明者 フェレル アビスンダ イシドロ
 スペイン マドリッド ポスエロ デ ア
 ラルコン エディフィシオ 1 カミノ
 デ ラス ウェルタス ヌメロ 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の診断方法

(57) 【要約】

本発明は、リソソームマーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することにある、アルツハイマー病の診断および/または予後診断方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A D の診断および / または予後診断方法であって、
生体試料中のリソソームマーカ-をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程と、
前記発現レベルを参照値と比較する工程と、
を含み、前記レベルの変化が A D を示すことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、リソソームマーカ-をコードする遺伝子が L a m p - 1 であることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、リソソームマーカ-をコードする遺伝子が L a m p - 2 であることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、前記生体試料が組織であることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、前記生体試料が体液であることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、前記体液が、脳脊髄液を含むことを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、リソソームマーカ-をコードする遺伝子の発現レベルの測定が、前記遺伝子またはそのフラグメントでコードされる m R N A の量を測定することによって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、m R N A の量の測定が、R T - P C R 増幅によって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、m R N A の量の測定が、D N A バイオチップによって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、リソソームマーカ-をコードする遺伝子の発現レベルの測定が、前記遺伝子および / またはそのフラグメントでコードされるタンパク質の量を測定することによって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、タンパク質の量の測定が、ウェスタンブロット法によって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、タンパク質の量の測定が、プロテインチップによって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 10 に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、タンパク質の量の測定が、免疫組織化学法によって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 14】

リソソームマーカ-をコードする遺伝子の発現レベルを請求項 1 から請求項 13 のいずれか 1 項に従って測定するのに必要な試薬を含むことを特徴とする、A D の診断および / または予後診断のためのキット。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、リソソームマーカをコードする遺伝子の発現レベルの測定が、前記遺伝子でコードされる m R N A またはタンパク質に特異的に結合する指示物質によって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の A D の診断および / または予後診断方法であって、リソソームマーカ遺伝子の発現レベルが、画像によって測定されることを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 15 から請求項 16 のいずれか 1 項に記載の A D の診断および / または予後診断のためのキットであって、前記遺伝子でコードされる R N A またはタンパク質に特異的に結合するレポーター物質、および生理学上許容される担体液を含有する組成物を含み、前記レポーター物質が、検出方法によって検出できる標識で標識されることを特徴とするキット。

10

【請求項 18】

A D の診断のための遺伝子マーカとしての L a m p - 1 および L a m p - 2 から選択される、リソソームマーカをコードする少なくとも 1 種の遺伝子の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明の適用分野は、健康領域、主として神経変性疾患に関連した領域内にあり、具体的にはアルツハイマー病の診断方法を目的とする。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病 (A D) は、痴呆の主な原因であると考えられ、痴呆は先進国における第 4 番目の死因である (1)。アルツハイマー病は、中枢神経系の神経変性罹病として定義され、高次脳機能の進行性劣化で特徴付けられる。

【0003】

A D は、数あるその他の病理の中でも、老人斑 (びまん性および古典型)、神経原線維変化、神経網系屑、神経細胞変性、 A - アミロイドタンパク質沈着、顆粒球空胞変性および平野小体 (H i r a n o b o d i e s) の存在によって顕微鏡学的に特徴付けられる (2)。

30

【0004】

米国精神医学会の「診断と統計マニュアル」の第 4 版 (D S M - I V) (3) によって、または神経、コミュニケーション障害および脳卒中学会 - アルツハイマー病および関連疾患協会 (N a t i o n a l I n s t i t u t e o f N e u r o l o g i c , C o m m u n i c a t i v e D i s o r d e r s a n d S t r o k e - A l z h e i m e r ' s

D i s e a s e a n d R e l a t e d D i s o r d e r s A s s o c i a t i o n) (N I N C D S - A D R D A) (4) によって明確に確立された臨床的判断基準を使用して A D を診断する。しかし、これらの臨床的研究の最も大きなジレンマは診断の確実性である。現在、臨床的診断を確認する唯一の方法は、脳組織の剖検分析を実施して神経原線維変化およびプラークの存在を見出すことである。

40

【0005】

最近、種々の遺伝子マーカが、A D の診断でのそれらの応用について研究されてきた。例えば、

- アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) 遺伝子、プレセニン - 1 (P S 1) 遺伝子、およびプレセニン - 2 (P S 2) 遺伝子の突然変異の測定、これは、早発性または家族性発症を呈する少数の A D 症例に対してのみ有効 (5)。

- A p o E 遺伝子型の遺伝値、これは、 p r o b a b l e A D の臨床的判断基準を満た

50

すAD症例でのみ測定され、はなはだしい数の疑陽性を与えることが問題である。

【0006】

これらの遺伝子マーカーに加えて、生化学マーカーが存在する。例えば、

- タウタンパク質：このタンパク質は、脳脊髄液中のタウを検出できる神経抗体を使用して測定されるが、ADにおけるタウ濃度は、年齢、性、疾患の進行、または痴呆の程度に関連性がなく、加えて、髄膜炎、髄膜浸潤、前頭性痴呆およびクロイツフェルトヤコブ病などのその他の病理で高いタウ濃度を検出する。
- A-アミロイドタンパク質：このタンパク質は、散発型ADにおける診断上の有用性に欠ける(6)。

【0007】

【非特許文献1】Pappolla MA. La Neuropatologia y la Biologia Molecular de la Enfermedad de Alzheimer. pp. 543-553. In: Neuropatologia. Diagnostico y Clinica. Cruz-Sanchez FF. Ed. Edimsa. 2000.

【非特許文献2】Cruz-Sanchez FF et al. Neuropathological Diagnostic Criteria for Brain banking. Ed. IOS Press. 1995.

【非特許文献3】American Psychiatric Association. Diagnostic criteria from DSM-IV. Washington DC: APA; 1994

【非特許文献4】McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. "Clinical diagnosis of Alzheimer's Disease: report of the NINCDA RDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology 1984; 34: 939-44.

【非特許文献5】Gil Necija Eulogio. Diagnostico biologico. Cuarto curso nacional de Enfermedad de Alzheimer. Sevilla, 23-24 September 1999. Ed. Andromico.

【非特許文献6】Guiera A. et al. "Actualizacion sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer". Rev Esp Patol 2002; Vol 35, no. 1: 21-48.

【非特許文献7】H. Braak and E. Braak, Temporal sequence of Alzheimer's disease related pathology. In: A. Peters and J. H. Morrison, (eds.), "Cerebral cortex, vol. 14, Neurodegenerative and age-related change in structure and function of cerebral cortex", Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 1999, 475-512

【非特許文献8】A. M. Cataldo, P. A. Paskevich, E. Kominiarid R. A. Nixon. "Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer disease". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88

10

20

30

40

50

(1991) 10998 - *11002 .

【非特許文献9】A. M. Cataldo, J. L. Barnett, D. M. Mann and R. A. Nixon. "Co-localization of lysosomal hydrolase and beta-amyloid in diffuse plaques of the cerebellum and striatum in Alzheimer's disease and Down's syndrome". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55 (1996) 704 - 715 .

【非特許文献10】A. M. Cataldo, J. L. Barnett, C. Pieroni and R. A. Nixon. "Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis". *J. Neurosci.* 17 (1997) 6142 - 6151 .

【非特許文献11】I. Ferrer, M. Boada, M. L. Sanchez, M. J. Ray and F. Costa-Jussa. "Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-13 immunization in Alzheimer's disease". *Brain Pathol.* 14 (2004) 11 - 20 .

【非特許文献12】N. K. Gonatas, W. Anderson and I. Evangelista I. "The contribution of altered synapses in the senile plaque: An electron microscopic study in Alzheimer's dementia". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26 (1967) 25 - 39 .

【非特許文献13】A. Kenessey, P. Nacharaju, L. W. Ko and S. H. Yen. "Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration". *J. Neurochem.* 69 (1997) 2026 - 2038

【非特許文献14】F. Lim, F. Hernandez, J. K. Lucas, P. Gomez-Ramos, M. A. Moran and J. Avila. "FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and tau filaments in forebrain". *Mol. Cell Neurosci.* 18. (2001) 702 - 714 .

【非特許文献15】P. M. Mathews, C. B. Guerra, Y. Jiang, O. M. Grbovic, B. H. Kao, S. D. Schmidt, R. Dinakar, M. Merchken, A. Hille-Rehfeld, J. Rohrer, P. Mehta, A. M. Cataldo and R. A. Nixon. "Alzheimer's disease-related over-expression of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor increases A secretion: role for altered lysosomal hydrolase distribution in -amyloidogenesis". *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5299 - 52307 .

【非特許文献16】J. A. R. Nicoll, D. Wilkinson, C. Holmes, P. Steart, H. Markham and R. O. Weller. "Neuropathology of human Alzheimer disease a

10

20

30

40

50

fter immunization with amyloid-peptide: a case report". Nat. Med. 9 (2003) 448-452

【非特許文献17】A. M. Cataldo, C. M. Peterhoff, S. D. Schmidt, N. B. Terio, K. Duff and M. Beard. "Presenilin mutation in familial Alzheimer disease and transgenic mice models accelerate neuronal lysosomal pathology". J. Neuropathol. Exp. Neurol. 63 (2004) 821-830.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0008】

アルツハイマー病に対して適切な感度、特異性および予測値を備えたほとんど侵襲性のないかなる診断手段も、現在の所まだ存在しない。さらに、この疾患は、中でも患者が自立する能力をもたないがゆえに、莫大な社会的コストを必要とし、従って、疾患の予防、治療の改善および進行の予測を可能にする、マーカーを使用する信頼できる診断方法が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、リソソームマーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することによって、アルツハイマー病を診断および/または予後診断する方法を提供する。リソソームマーカーは、好ましくはLamp-1またはLamp-2である。

20

【0010】

本発明の特定の態様は、生体試料中のリソソームマーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定すること、および前記レベルを参照レベルと比較することによって、アルツハイマー病をインビトロで診断および/または予後診断する方法を提供し、前記レベルの変化は、アルツハイマー病および前記疾患のステージを示す。

【0011】

本発明で「参照値」とは、前記リソソームマーカー遺伝子でコードされるmRNAまたはタンパク質の濃度に影響を及ぼすADまたはその他の疾患に罹患していない健全な個体中に存在するリソソームマーカー遺伝子でコードされるmRNAおよびタンパク質の濃度を指す。

30

【0012】

本発明の好ましい実施形態によれば、リソソームマーカーをコードする遺伝子は、好ましくは、Lamp-1またはLamp-2である。

【0013】

本発明の好ましい実施形態によれば、生体試料は組織を含み、前記組織は、好ましくは組織ホモジェネートである。組織ホモジェネートは、好ましくは、神経組織細胞または末梢神経内分泌細胞から得られる。

【0014】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、生体試料は生体液であり、前記生体液は、好ましくは、脳脊髄液、血液または血清を含む。

40

【0015】

リソソームマーカーをコードする遺伝子の発現レベルの測定は、特定の実施形態で、前記遺伝子またはそのフラグメントでコードされるmRNAの量を測定することによって実施される。リソソームマーカー遺伝子は、好ましくはLamp-1またはLamp-2である。

【0016】

前記遺伝子またはそのフラグメントでコードされるmRNAの量の分析は、PCR、SDAに特有なオリゴヌクレオチドを使用する増幅、あるいはリソソームマーカー転写のレベルを定量的に見積ることを可能にする任意のその他のcDNA増幅によって好ましくは

50

実施される。

【0017】

前記遺伝子またはそのフラグメントでコードされるmRNAの量の分析は、当業者に周知の任意の機構で沈着された、あるいはホトリソグラフィーによってまたは当業者に周知の任意のその他の機構によってインサイチュ(in situ)で合成されたオリゴヌクレオチドで構成されたDNAバイオチップによって好ましくは実施される。

【0018】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、リソソームマーカー(lysosomal marker)をコードする遺伝子の発現レベルの測定は、前記遺伝子またはそのフラグメントでコードされるタンパク質の量を測定することによって実施される。測定されるタンパク質は、好ましくはLamp-1またはLamp-2である。

10

【0019】

前記遺伝子またはそのフラグメントでコードされるタンパク質の量の測定は、好ましくは、ウェスタンブロット法によって実施される。

【0020】

前記遺伝子またはそのフラグメントでコードされるタンパク質の量の測定は、また、リソソームマーカーに対する特異的抗体の抗体またはフラグメントを使用するプロテインチップによって、あるいは質量分光法またはリソソームマーカーのタンパク質濃度を定量的に見積ることを可能にする任意のその他の機構によって実施されるタンパク質プロフィールによって実施される。

20

【0021】

別の好ましい実施形態において、前記遺伝子またはそのフラグメントでコードされるタンパク質の量の測定は、免疫組織化学法によって実施される。

【0022】

本発明の別の好ましい実施形態は、画像解析によって、リソソームマーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することを含む。

【0023】

本発明のより具体的な実施形態によれば、リソソームマーカーをコードする遺伝子の発現レベルの測定は、免疫組織化学画像上での定量化による画像解析によって実施される。定量化法の例には、限定はしないが、形態計測法、濃度計測法および蛍光強度法が含まれる。

30

【0024】

本発明の別の態様は、リソソームマーカーをコードする遺伝子の発現レベルの測定を実施するのに、好ましくはLamp-1またはLamp-2の発現レベルを測定するのに必要な試薬類を含有する、アルツハイマー病を診断および/または予後診断するためのキットから構成される。該キットによって、いままで説明してきた本発明による方法を実施することが可能になる。

【0025】

アルツハイマー病を診断および/または予後診断するためのキットは、リソソームマーカー遺伝子でコードされるmRNAの濃度を測定するのに必要な試薬類を好ましくは含有し、かつリソソームマーカー遺伝子でコードされるmRNAの濃度を増幅によって測定するのに必要な試薬類をより好ましくは含有する。

40

【0026】

アルツハイマー病を診断および/または予後診断するためのキットは、リソソームマーカー遺伝子でコードされるmRNAの濃度を測定するのに必要な試薬類を好ましくは含有する。それは、DNAバイオチップによってリソソームマーカー遺伝子でコードされるmRNAの濃度を測定するのに必要な試薬類を好ましくは含有する。

【0027】

一方、アルツハイマー病を診断および/または予後診断するためのキットは、リソソームマーカー遺伝子でコードされるタンパク質の濃度を測定するのに必要な試薬類を含有す

50

ることができる。それは、ウェスタンブロット法によってリソソームマーカ-遺伝子でコードされるタンパク質の濃度を測定するのに必要な試薬類を好ましくは含有する。

【0028】

アルツハイマー病を診断および/または予後診断するためのキットは、リソソームマーカ-遺伝子でコードされるタンパク質の濃度を測定するのに必要な試薬類を好ましくは含有する。それは、プロテインチップによってリソソームマーカ-遺伝子でコードされるタンパク質の濃度を測定するのに必要な試薬類を好ましくは含有する。

【0029】

アルツハイマー病を診断および/または予後診断するためのキットは、リソソームマーカ-遺伝子でコードされるタンパク質の濃度を測定するのに必要な試薬類を好ましくは含有する。それは、免疫組織化学法によってリソソームマーカ-遺伝子でコードされるタンパク質の濃度を測定するのに必要な試薬類を好ましくは含有する。

【0030】

本発明の好ましい実施形態によれば、リソソームマーカ-をコードする遺伝子の発現レベルの測定は、前記遺伝子でコードされる mRNA またはタンパク質に特異的に結合するレポ-ティング物質によって実施される。

【0031】

本発明で「レポ-ティング物質」は、抗体、モノクロナ-ル抗体、オリゴヌクレオチド、巨大分子、有機分子、あるいは一般には、リソソームマーカ-遺伝子でコードされる mRNA またはタンパク質に特異的に結合できる任意の物質を指す。前記の指示物質は、酵素、放射性同位元素、染料、蛍光化合物、化学発光化合物、生物発光化合物、金属キレートでよい標識、あるいは一般には、検出方法によって検出できる最新技術で周知の任意の標識を含む。

【0032】

本発明の特定の態様は、リソソームマーカ-をコードする遺伝子の発現レベルの測定を実施するのに必要な試薬類を含み、前記遺伝子でコードされる mRNA またはタンパク質に特異的に結合するレポ-ター物質および生理学的に許容される液体を含有する組成物を含み、前記の指示物質が、検出可能なマーカ-で標識されている、アルツハイマー病を診断および/または予後診断するためのキットによって構成される。

【0033】

本発明の特定の態様は、アルツハイマー病を診断および予後診断するための遺伝子マーカ-として、Lamp-1 および Lamp-2 から選択される、リソソームマーカ-をコードする少なくとも別の遺伝子マーカ-の使用によって示される。

【0034】

本発明のその他の態様も、当業者にとって明らかであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0035】

本発明は、疾患の早期診断、および AD 患者の進行評価に対して大きな重要性を有する、簡単かつ信頼できる方法でアルツハイマー病を診断および予後診断する方法を提供する。

【0036】

実験は、AD 患者の脳試料および対照脳試料における、Lamp-1 mRNA およびタンパク質の発現レベルを比較して実施した。

【0037】

脳試料は、11体のAD患者および4体の対照の剖検によって獲得した。患者または親族のインフォームドコンセントが義務付けられ、研究は倫理委員会により承認された。

【0038】

死亡と組織処理の間の時間は2~10時間であった。脳の半分を厚さ1cmの冠状切片に切断し、ドライアイス中、-80℃で使用するまで凍結した。

【0039】

10

20

30

40

50

形態学的検査のために、脳を10%ホルマリン緩衝液に2または3週間浸漬して固定した。

【0040】

神経学的研究は、前頭(8野)、一次運動、一次感覚、頭頂、上側頭、下側頭、前帯状、前島および視覚の連合および一次皮質；内嗅皮質および海馬；尾状核、被殻および外套；中央および後視床；視床下部；マイネルト核；小脳扁桃；中脳、脳橋および延髄；ならびに小脳皮質および歯状核の厚さ4 μ mのワックス不含パラフィン切片で実施した。

【0041】

切片は、ヘマトキシリン-エオシンで、グリア線維酸性タンパク質の免疫組織化学法のためのクリューパーバレー法を用いるルクソールファーストブルーで、ミクログリア(A - アミロイド、全タウ、Thr181、Ser202、Ser214、Ser262、Ser396およびSer422で特異的にリン酸化されたタウ、ならびに B - クリスタリン、 α -シヌクレインおよびユビキノン)用のCD68およびトマトレシチンで染色した。

10

【0042】

ADのステージは、アミロイド沈着量により、ならびにBraakおよびBraak分類に従った神経原繊維病理により確立された(7)。すなわち、

ステージA：基底新皮質における初期沈着

ステージB：新皮質関連領域に拡大した沈着

ステージC：全皮質における広範な沈着

20

I~II：経嗅内における神経原線維の病理段階

III~IV：大脳周辺系の病理段階

V~VI：新皮質の病理段階。

【0043】

6体の患者をAD I~IIA/Bとして、および5体をAD V~VICとして分類した。主な臨床および神経病理学的データを表1に要約する。これらの患者は、いかなる関連病理(血管性、シヌクレイン症)も呈さない。アミロイドペプチドでの免疫感作後に脳炎を呈示しているAD患者の脳(11)を比較の目的で研究に含めた。

【0044】

対照個体の前頭皮質試料をさらに含め、これらの試料は、死後3時間に得られ、若干のものは直ちに凍結し、その他のものは4で3、6、および22時間貯蔵し、後に凍結し、処理組織における変動する剖検遅延、およびLamp-1 mRNAの保存における遅延の影響を限定した。

30

【0045】

試料を調製したら、Lamp-1 mRNA、およびタンパク質の双方の測定を実施し、生化学的、免疫組織化学的および顕微鏡的研究を実施例に記載したように実施した。対照および罹病脳の試料を並行して処理した。これらの研究の結果は、進行したADステージの大脳皮質におけるLamp-1 mRNAおよびタンパク質の発現レベルが増加していることを示している。Lamp-1は、さらに、神経細胞の細胞質中、および老人斑を取り囲んでいるジストロフィー性神経炎中に存在する。

40

【実施例】

【0046】

以下の実施例は、本発明を説明するのに有用であるが、本発明を限定するものではない。

【0047】

実施例1：mRNAの単離、ならびにcDNA合成およびTaqMan PCRによる結果の確認：

全RNAを、Trizol Reagent(登録商標)(Life Technologies)、続いてRNeasy Protect Mini Kit(Qiagen)を使用して単離した。凍結ヒト脳組織を、100mgの組織につき1mlのTrizo

50

l 中で直接にホモジナイズした。供給業者が提案しているプロトコルを利用して全RNAを抽出した。次いで、精製した全RNAを100 μ lのRNAアーゼ(RNase)不含水中に再懸濁し、mRNAを、最小の修正を伴うRNeasy Protect Mini Kitのプロトコルに従って精製した。Trizolでの抽出中にゲノムDNAが排除されるため、DNアーゼ(DNase)での処理は除外した。各試料の濃度をA₂₆₀で測定し、RNAの完全性を、ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動によって確認した。

【0048】

次いで、cDNA合成およびTaqMan PCRを実施した。それぞれ100 μ lの逆転写反応の場合、2.5 μ Mのランダムヘキサマーを含む2 μ gのヒトRNA、RT TaqMan 1xバッファー、5.5mM MgCl₂、それぞれ500 μ MのdATP、dTTP、dCTPおよびdGTP、0.4U/ μ lのRNAアーゼ阻害剤および1.25U/ μ lのMultiScribe逆転写酵素(Applied Biosystems)である。反応は、鑄型RNAのプライマーへの結合を最大にするため25 $^{\circ}$ で10分間、続いて48 $^{\circ}$ で30分間実施し、次いで、逆転写酵素を失活させるために95 $^{\circ}$ で5分間インキュベートした。ゲノムDNAによる汚染度をチェックするため、各RNA試料についてMultiScribe逆転写酵素の不在下で並行反応を実施した。

10

【0049】

TaqManプローブ(Applied Biosystems)は、ダイレクト(direct)およびリバースプライマーの間の鑄型DNA鎖に結合する。プローブは、増幅中にTaqポリメラーゼによって放出されるレポーター染料を含み、従って、発生する蛍光は、蓄積した産生物の量に比例する。

20

【0050】

内部対照として β -アクチンおよび β -グルクロニダーゼ(GUS)を使用した。Lamp-1、GUSおよび β -アクチンのためのプライマーおよび特異的蛍光プローブは、Taq-Man Gene Expression Assays(Applied Biosystems)から購入した。

【0051】

Lamp-1および内部対照に関するTaqMan PCRアッセイは、ABI Prism 7700 Sequence Detection system(PE Applied Biosystem)上の96穴プレート中のcDNA試料について3回実施した。20 μ lのTaqMan反応の場合、9 μ lのcDNA(1/50に希釈、ほぼ4ngのRNAに相当)を、1 μ lの20x TaqMan Gene Expression Assaysおよび10 μ lの2x TaqMan Universal PCR 30 Master Mix(Applied Biosystem)と混合した。標定のため、プライマーおよび β -アクチンおよびGUSを備えたプローブを使用して各試料に対して並行研究を実施した。反応は、次のパラメーター、すなわち、50 $^{\circ}$ で2分間、95 $^{\circ}$ で10分間、および95 $^{\circ}$ で15秒および60 $^{\circ}$ で1分間の40サイクルを使用して実施した。Lamp-1および各内部対照に関して、ヒトRNA対照試料の希釈系列を使用して標準曲線を調製した。Sequence Detector Software(SDSバージョン1.9; Applied Biosystem)を使用して、TaqMan PCRデータを最終的に取り込んだ。

30

40

【0052】

Lamp-1 mRNA濃度は、対照脳試料およびADを用いたTaqMan PCRアッセイにより確認した。ABI 7700は、ベースラインより高いレベルに手動で指定される自由裁量値であるサイクル閾値(Ct)を連続的に監視することによって、制約因子のない指数期のPCRにおけるPCRの蛍光累積値を測定する。Ct値は、試料増幅が閾値と交差する点を明らかにする(図1A)。各試料に対して、全対照RNA(ng)の対数に対するCt(Y)を示すようにプロットした標準曲線から、ターゲットおよび内部対照の量を決定する。各Lamp-1ターゲットの量を内部対照の量で除して、対照試

50

料および病理試料における相対的 Lamp - 1 mRNA 濃度の決定を可能にする標準ターゲット値を得る。Lamp - 1 mRNA 値を標定するのに使用される内部対照の濃度は、対照と比較される病理試料で修正されず、さらに、異なる病理の間で類似している。

【0053】

結果は、対照と比較した場合、ステージ V ~ V I C に属する A D における前頭皮質中の Lamp - 1 mRNA 濃度の相対的増加を示した： $p < 0.05$ 、LSD 検定 (post-hoc フィッシャー最小有意差法) を用いた ANOVA (図 2 A)。前頭皮質中の Lamp - 1 mRNA 濃度は、対照値と比較して早期ステージの A D (ステージ I ~ I I A / B) で変わらなかった (図 2 A)。

【0054】

実施例 2：ゲル電気泳動およびウェスタンブロッティング：

凍結した前頭皮質試料 (8 野、100 mg) を 1 ml の溶解緩衝液 (20 mM Hepes、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM DDT、2 mM PMSF、1 μg/ml アプロチニン、ロイペプチンおよびペプスタチン) 中で直接にホモジネートし、超音波処理にかけた。溶解物を 4、5、000 rpm で 10 分間遠心し、タンパク質濃度を BCA 法 (Pierce) によって測定した。50 μg の全タンパク質を 95 にさらし、次いで、Tris - グリシン溶離緩衝液を用いる SDS - ポリアクリルアミドゲル中に注入した。タンパク質を Mini-Protein 装置 (Bio-Rad) を使用する電気泳動にかけ、Mini Trans Blot 電気泳動転写セル (Bio-Rad) を用いてニトロセルロース膜 (Bio-Rad) に 100 V、1 時間で転写した。ニトロセルロース膜を、5% のスキムミルクを含む Tween 20 TBS (TBST) で 30 分間ブロックした。次いで、膜を、3% BSA を含む TBST 中、一次抗体の 1 つと共に 4 で一夜インキュベートした。次の抗体、すなわち、1:1000 希釈の anti-Lamp - 1 抗体 (H-228、sc-5570、Santa Cruz)、1:5000 希釈の anti- - アクチン抗体 (AC-74 クローン、Sigma) を使用した。一次抗体と共にインキュベートした後、膜を、室温で 5 分間、TBST で洗浄し、次いで、1:1000 (- アクチンには 1:5000) 希釈のハツカダイコンペルオキシダーゼ (Dako) で標識したウサギおよびマウスの anti-IgG 抗体と共に、室温で 1 時間インキュベートした。次いで、膜を、室温で 4 回 (各回 5 分)、TBST で洗浄し、ECL ウェスタンブロッティング化学発光装置 (Amersham/Pharmacia) で発光させ、次いで、膜を、オートラジオグラフィフィルム (Hyperfilm ECL、Amersham) に露光した。

【0055】

ウェスタンブロットバンドの濃度計測量は、TotalLab v2.01 ソフトウェアによって実施した。統計解析には Statgraphics Plus v5 を使用した。

【0056】

結果は、Lamp - 1 タンパク質濃度が、Lamp - 1 mRNA 濃度と同様、対照試料と比較して、ステージ V ~ V I C の A D の前頭皮質中で増加していることを示したが ($p < 0.001$ 、LSD 検定での ANOVA)、ステージ I ~ I I A / B の早期 A D での増加はなかった (図 3)。

【0057】

実施例 3：免疫組織化学：

前頭皮質、海馬および嗅内皮質の 5 μm 厚ワックス不含切片を、標識化ストレプトアビジン - ビオチンペルオキシダーゼ (LSAB) 法による免疫組織化学に向けて処理した。メタノールおよび H₂O₂ / PBS で、および正常血清中でインキュベートした後、切片を、1:100 希釈の anti-Lamp - 1 抗体 (Santa Cruz) でインキュベートした。一次抗体でインキュベートした後、切片を室温で 15 分間、LSAB でインキュベートした。ペルオキシダーゼ反応は、ジアミノベンジジンおよび H₂O₂ で調べた。免疫染色対照は、一次抗体が脱落しており、二次抗体でのインキュベーションの後にシグナ

10

20

30

40

50

ルはまったく得られなかった。切片は、ヘマトキシリンでわずかに染色された。

【0058】

小さな細胞質顆粒で特徴付けられる中程度のLamp-1免疫反応性が、対照試料の神経細胞およびミクログリア細胞中に見出され(図4A、図4B)、一方、Lamp-1免疫反応性の増加が、ADの皮質神経細胞中に見出された(図4C)。

【0059】

奇妙なことに、この増加は、錯綜中にLamp-1免疫反応性が見出されなかったので、個々の神経細胞のNFT病理に関係していなかった(図4D、図4E)。Lamp-1免疫反応性の増加は、海馬の顆粒球空胞変性をもつ神経細胞中にも見出され(図4F)、ステージI~IIBのADの前頭皮質中に限定されるが(症例8)、ステージV/VICのADの前頭皮質中で極めて目立つ強いLamp-1免疫反応性が、神経炎ブランク細胞中に見出された(図5)。

10

【0060】

実施例4：二重標識免疫蛍光法および共焦点顕微鏡法：

前頭皮質のワックス不含切片をスーダンブラックB飽和溶液(Merck)で30分間染色して神経細胞体中に存在するリポフスチン顆粒の自己蛍光をブロックし、70%エタノールで洗い流し、蒸留水で洗浄した。切片を、1:100希釈を使用するマウスポリクロナールanti-Lamp-1抗体(Santa Cruz)、および1:50希釈のモノクロナールA-アミロイド抗体(Dako)、1:50希釈のマウスantiAT8抗体(Innogenetics、Gent)、または1:100希釈のCD68(Dako)で、一夜4℃でインキュベートした。次いで、切片を、PBSで洗浄し、二次抗体カクテルで暗室にてインキュベートし、一次抗体と同じ担体溶液中に室温で45分間希釈した。二次抗体は、1:400希釈のウサギAlexa488(緑色)およびマウスAlexa546(赤色)(双方とも、オレゴン州、Molecular Probesから)とした。PBSで洗浄した後、切片を、Immuno Fluore マウンティング培地(ICN Biomedicals、バルセロナ)に載せ、密封し、一夜乾燥した。Leica TCS-SL共焦点顕微鏡で切片を調べた。

20

【0061】

AT8抗体で示されるような、Lamp-1発現と神経原線維変性の共存がないことは、二重標識免疫蛍光法および共焦点顕微鏡法でも示された。強いLamp-1免疫反応性を示す神経細胞は、免疫反応性の低いリン酸化-タウタンパク質の沈着を有し、一方、神経原線維ブランク神経細胞は、低いLamp-1免疫反応性を示した(図6)。

30

【0062】

ブランクに関係した強い免疫反応性は、Lamp-1およびA-アミロイドで免疫染色された切片中に現われたように、アミロイドの中央領域を取り囲んでいる細胞突起に限定されていた。Lamp-1免疫反応性は、びまん性ブランク関連して観察されることは稀であるが、若干の免疫反応性が、A-アミロイド凝縮突起で生じた(図7)。

【0063】

Aで免疫感作した後の脳炎を伴うADにおけるLamp-1免疫反応性：

Aで免疫感作した後の脳炎を伴うAD患者は、通常のAD患者と比べ、大脳アミロイド蓄積量の低減、残存ブランク中のリン酸化-タウの低減または不在、およびミクログリアおよびA-アミロイド残渣を有する多核化巨大細胞の著しい活性化を示した(13、19)。ウェスタンブロット法での発現レベルは、この場合、通常のADと同様であった(図8A)。

40

【0064】

しかし、神経病理学的観察によれば、Lamp-1免疫反応性は、密なA-アミロイドブランクを取り囲むミクログリア細胞および多核化巨大細胞中に見出された(図8B)。

【0065】

Lamp-1発現試験は、二重標識免疫蛍光、ミクログリアおよび多核化巨大細胞用の

50

マーカーとして使用される L a m p - 1 および C D 6 8 でチェックし、それらの細胞を共焦点顕微鏡で調べた（図 9）。

【 0 0 6 6 】

考察：

データは、A D 患者の大脳皮質における L a m p - 1 の増加を示し、患者の m R N A およびタンパク質濃度は、前記疾患の進行と共に増加する。免疫組織化学法、二重標識化免疫蛍光法、および共焦点顕微鏡は、アミロイドプラークを取り囲んでいる神経炎において目立つ L a m p - 1 の局在性を示した。リソソーム加水分解酵素は、A D 脳の皮質神経細胞中の周核体および隣接樹状突起に局在し、老人斑において高濃度であった（ 8、 9 ）。

【 0 0 6 7 】

リソソームの攪乱が A D 脳における A - アミロイド沈着を促進すること（ 1 0、 1 5 ））、およびプレセニリンの突然変異が神経細胞のリソソーム病理の加速に関連していること（ 1 7 ））を示唆するいくつかの研究が存在する。L a m p - 1 免疫反応性突起（ i m m u n o r e a c t i v i t y p r o c e s s ）は、また、びまん性皮質プラーク、小脳、およびびまん性線条体プラーク中に発生するが、L a m p - 1 発現は、老人斑のジストロフィー性神経炎、次いでびまん性アミロイド沈着により関連している（ 9 ）。この意味で、A D における樹状突起およびシナプスは、増大した数のリソソームを含むことに留意すべきである（ 1 2 ））。

【 0 0 6 8 】

カテプシン D は、タウタンパク質の分解にも関連しており、このことは A D における神経原線維変化の分解でのリソソームの役割を示唆している（ 1 3 ）。これに関連して、タウタンパク質の三重突然変異をもつトランスジェニックマウスは、異常形態、および皮質神経細胞および海馬における過剰リン酸化タウの沈着を示す（ 1 4 ）。これらのデータは、リソソームの異常が、過剰リン酸化タウの沈着を伴う神経細胞変性の理由であり得ることを示唆している。

【 0 0 6 9 】

顆粒球空胞変性を伴う神経細胞中に著しい免疫反応性が見出されたが、結果は、L a m p - 1 発現と A D における神経原線維変化を伴う皮質神経細胞中の過剰リン酸化タウの沈着との間の逆の関係を示している。

【 0 0 7 0 】

A で免疫感作した後の脳炎を伴う A D 症例に関する研究は、隠された部分を明らかにするようなデータを示している。限られた数の症例における神経病理学的研究は、アミロイド蓄積量の低減、ならびにミクログリアの活性化およびアミロイド残渣に満ちた多核化巨大細胞の存在と一緒にアミロイドプラークの低減を示している；すなわち、神経原線維変化を伴う神経細胞は影響を受けないが、過剰リン酸化タウタンパク質は、崩壊したプラーク中に観察されなかった（ 1 1、 1 6 ）。L a m p - 1 免疫反応性は、A で免疫感作した後の神経細胞突起中に見出されなかったが、それは、ミクログリア細胞、およびアミロイドおよび細胞残渣を含む多核化巨大細胞中に見出された。

【 0 0 7 1 】

10

20

30

【表 1】

患者	疾患	性別	年齢(歳)	疾患継続期間 (年)	死後 (時間)	Braakステージ	
						β A4-アミロイド	NFT
1	対照	F	73	—	5		
2	対照	M	75	—	6		
3	対照	F	79	—	7		
4	対照	F	80	—	3		
5	AD	M	59	—	7	A	I-II
6	AD	M	69	—	10	A	I-II
7	AD	F	73	—	4	A	I-II
8	AD	M	78	—	7	B	I-II
9	AD	F	84	—	5	A	I-II
10	AD	F	88	—	5	A	I-II
11	AD	M	69	8	6	C	V
12	AD	F	82	13	10	C	V
13	AD	F	84	10	2	C	VI
14	AD	F	86	8	10	C	VI
15	AD	M	93	11	7	C	V

10

20

30

40

50

表 1 : 研究の主な臨床および病理データ。Braak and Braak 分類による AD ステージおよび対照 ; M : 男、F : 女 ; NFT : 神経原線維変化

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図 1 A】対照ヒト脳の RNA の逐次希釈を使用する Lamp - 1 の増幅を示す図であって、水平線は、指数期における手動調整の閾値線を示し、蛍光強度は、PCR サイクルの増加と共に増大し、蛍光強度が閾値線を超える PCR サイクル数を、相対的数量化を基準とする CT 値と定義した図である。

【図 1 B】対照ヒト脳のいくつかの RNA 濃度から作図された、 β -アクチンおよび Lamp - 1 に対する代表的な標準曲線を示す図であって、対照試料の RNA 濃度の対数 (X 軸) に対する CT 値 (Y 軸) は逆直線の相関関係を示した図である。

【図 2 A】対照試料 (C、n = 4)、ステージ I - II A / B (Braak および Braak による) の 6 つの AD 症例 (ADI、n = 6)、およびステージ V - VI C の 5 つの AD 症例 (ADV、n = 5) の前頭皮質における Lamp - 1 mRNA 濃度 (平均値 \pm SEM) を示し、Lamp - 1 mRNA 濃度は β -アクチンで標定した図である。

【図 2 B】単一試料 (死後 3 時間) の前頭皮質中の β -アクチンおよび GUS で正規化した Lamp - 1 mRNA 濃度を示し、試料は、液体窒素中で直接凍結する (0 時間) か、あるいは室温で 3、6、または 22 時間放置し、次いで液体窒素中で凍結したものの図であり、22 時間まで mRNA の明らかな分解は起こらず、対照試料と比較して * p < 0.05 (post-hoc LSD 検定での ANOVA) であることを示す図である。

【図 3】前頭皮質 (8 野) ホモジェネート中のウェスタンブロット法によって検出される Lamp - 1 (約 125 kDa) を示す図であって、タンパク質の量の対照として β -アクチンを使用し、画像は、表 1 に示したすべての試料を代表している。Lamp - 1 タンパク質濃度 (平均 \pm SEM) の濃度計測分析は、TotalLab v2.01 ソフトウェアを用いて実施し、Lamp - 1 タンパク質値は、 β -アクチンで正規化し、対照試料と比較して *** p < 0.001 (post-hoc LSD 検定での ANOVA) ; n

・ s ・ : 対照と比較して有意差のない差異であることを示す図である。

【図4】前頭皮質 (A ~ E) および海馬状隆起 (F)、対照 (A、B) および A D 症例 (ステージ V C) (C ~ F) における L a m p - 1 免疫反応性の画像分析を示す図であって、中程度の L a m p - 1 免疫反応性が、A D の神経細胞細胞質中に見出され、神経原線維変化は、L a m p - 1 で染色されず (D、E)、顆粒球空胞変性を伴う神経細胞は、強い L a m p - 1 免疫反応性を示し、A および C、C 中の線分 = 5 0 μ m、B、D ~ F、F 中の線分 = 2 5 μ m であることを示す図である。

【図5】神経細胞中に加え、老人斑中 (A ~ D) のアミロイド沈着を取り囲んでいる細胞突起中に配置されていることを示す、L a m p - 1 免疫反応性の画像分析を示す図であって、線分 = 5 0 μ m を示す図である。

【図6】A D における L a m p - 1 (緑色) およびリン酸化 - タウ (A T 8 抗体、赤色) に対する二重標識免疫蛍光法の画像分析を示す図であって (重ね合わせ C および F、黄色)、リン酸化 - タウタンパク質の沈着を伴う神経細胞のほとんどは、L a m p - 1 の低い発現を示すが、一方、強い L a m p - 1 免疫反応性を伴うほんの僅かの神経細胞は、リン酸化 - タウの沈着を示し (A、B および D、E)、第 2 抗体のみで染色された対照断片は、陰性であった (G ~ I) ことを示す図である。

【図7】L a m p - 1 (緑色) および A - アミロイド (赤色)、ならびに共焦点顕微鏡法 (重ね合わせ、黄色) に対する二重標識免疫蛍光法の画像分析を示す図であって、免疫反応性 L a m p - 1 の沈着が、アミロイドプラークの周辺に見出され (A ~ C)、L a m p - 1 免疫反応性は、老人斑における A - アミロイド凝縮を伴って現われ、免疫反応性の無いまたはほとんど無い L a m p - 1 プロフィールが、びまん性プラーク中に現われ (D ~ F)、一方、免疫反応性 L a m p - 1 突起はアミロイド核を伴うプラーク中で増加し (G ~ I)、第 2 抗体のみで染色された対照断片は、陰性であった (J ~ L) ことを示す図である。

【図8A】ウェスタンブロット法で分析した、A ペプチドでの免疫感作後の脳炎を伴う A D 患者における大脳皮質中の L a m p - 1 タンパク質濃度を示す図である。それらをステージ V ~ V I / C の A D と比較した場合、発現レベルの差異は観察されなかった。

【図8B】免疫反応性は、崩壊したアミロイド沈着を取り囲んでいるミクログリア細胞 (A ~ C) および多核化巨大細胞 (D ~ E) 中に主として現われことを示している、L a m p - 1 免疫反応性の画像分析を示し、結果は、A - アミロイド残渣の食作用であり、A および B、B 中の線分 = 5 0 μ m、C ~ F、F 中の線分 = 2 5 μ m を示す図である。

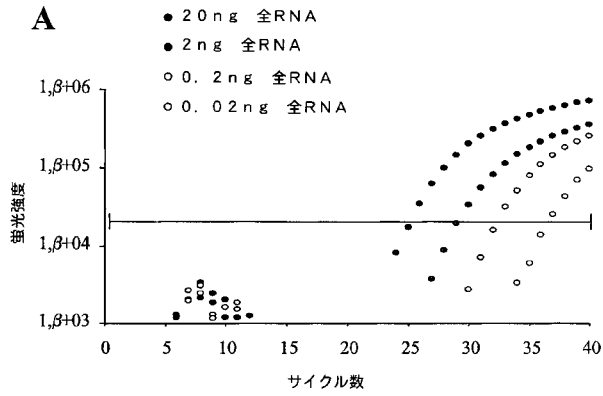
【図9】A ペプチドで免疫感作後の脳炎を伴う A D 患者における、L a m p - 1 (緑色) および C D 6 8 (赤色)、ならびに共焦点顕微鏡法 (重ね合わせ、黄色) に対する二重標識免疫蛍光法についての画像分析を示す図であって、L a m p - 1 免疫反応性は、ミクログリア細胞および多核化巨大細胞中に見出され (A ~ F)、第 2 抗体のみで染色された対照切片は、陰性であった (G ~ I) ことを示す図である。

10

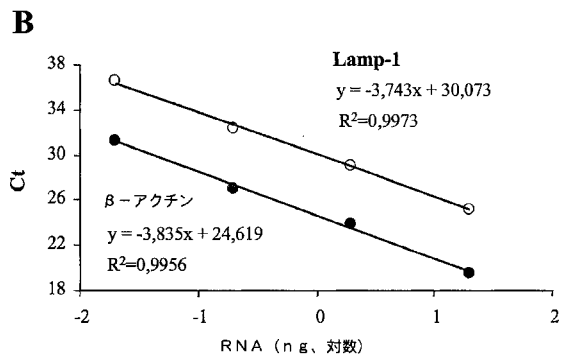
20

30

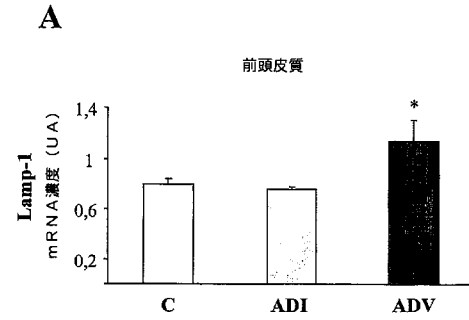
【 図 1 A 】



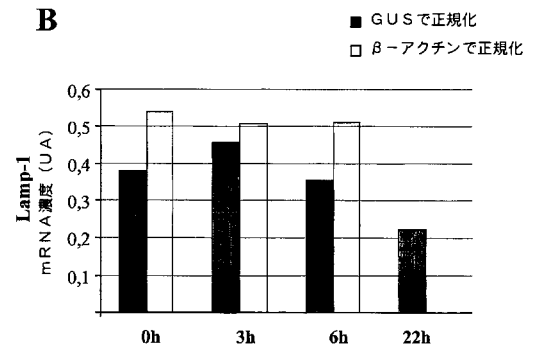
【 図 1 B 】



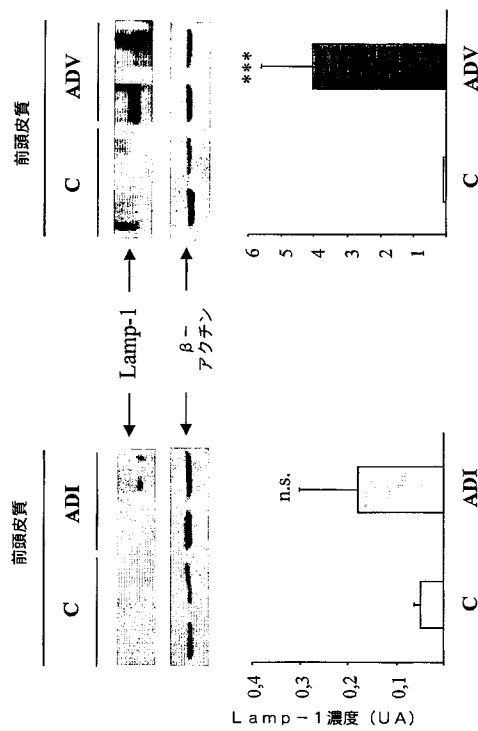
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【 図 3 】



【 図 4 】

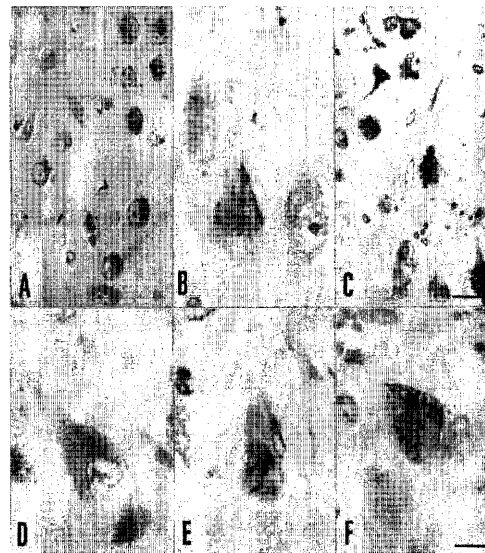


FIG. 4

【 図 5 】

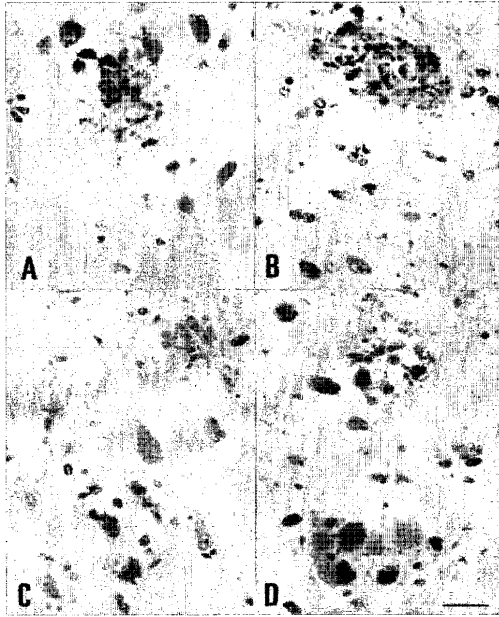


FIG. 5

【 図 6 】

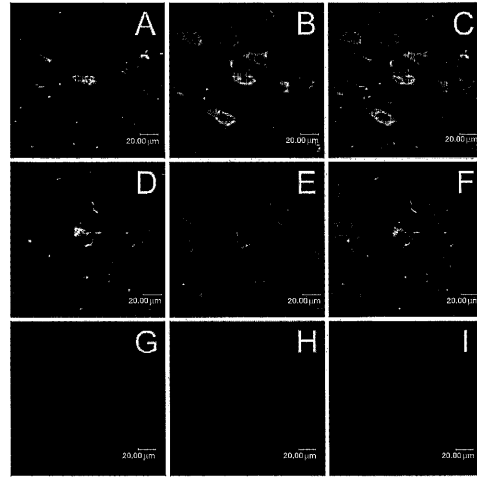


FIG. 6

【 図 7 】

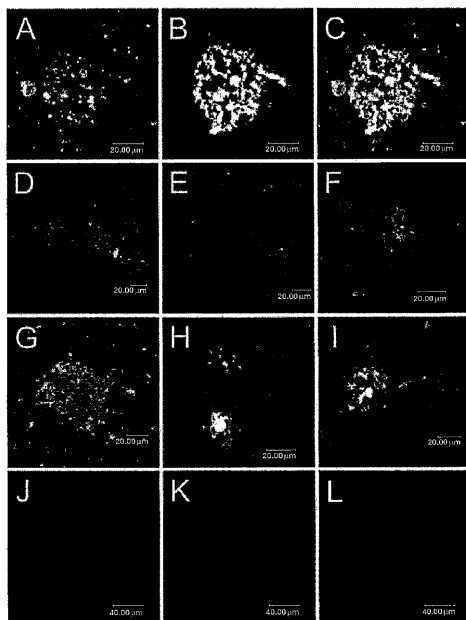
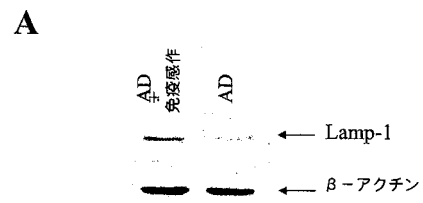


FIG. 7

【 図 8 A 】



【 図 8 B 】

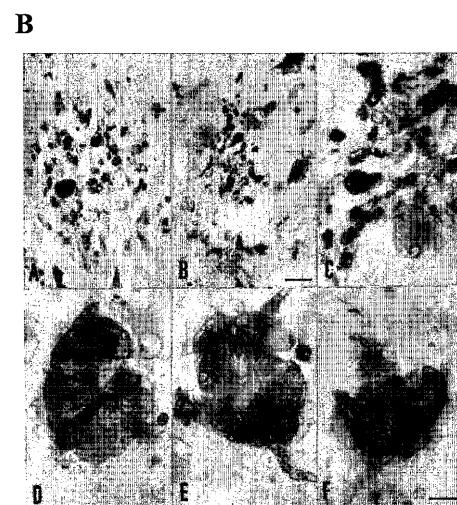


FIG. 8

【 図 9 】

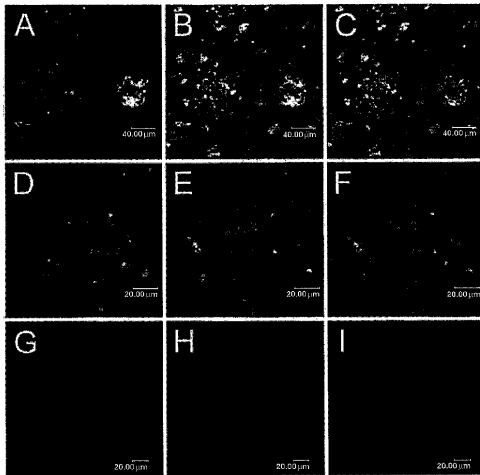


FIG. 9

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成19年11月19日(2007.11.19)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ヒトの A D の診断および / または予後診断方法であって、
 生体試料中の L a m p - 1 をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程と、
 前記発現レベルを参照値と比較する工程と、
 を含み、前記レベルの変化がヒトの A D を示すことを特徴とする方法。

【 請求項 2 】

請求項 1 に記載のヒトの A D の診断および / または予後診断方法であって、生体試料が細胞であることを特徴とする方法。

【 請求項 3 】

請求項 1 に記載のヒトの A D の診断および / または予後診断方法であって、前記生体試料が体液であることを特徴とする方法。

【 請求項 4 】

請求項 3 に記載のヒトの A D の診断および / または予後診断方法であって、前記体液が、脳脊髄液を含むことを特徴とする方法。

【 請求項 5 】

請求項 1 に記載のヒトの A D の診断および / または予後診断方法であって、L a m p - 1 をコードする遺伝子の発現レベルの測定が、前記遺伝子またはそのフラグメントでコー

ドされる mRNA の量を測定することによって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のヒトの AD の診断および / または予後診断方法であって、mRNA の量の測定が、RT-PCR 増幅によって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のヒトの AD の診断および / または予後診断方法であって、mRNA の量の測定が、DNA バイオチップによって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のヒトの AD の診断および / または予後診断方法であって、Lamp-1 をコードする遺伝子の発現レベルの測定が、前記遺伝子および / またはそのフラグメントでコードされるタンパク質 Lamp-1 の量を測定することによって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のヒトの AD の診断および / または予後診断方法であって、タンパク質の量の測定が、ウェスタンブロット法によって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 8 に記載のヒトの AD の診断および / または予後診断方法であって、タンパク質の量の測定が、プロテインチップによって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 8 に記載のヒトの AD の診断および / または予後診断方法であって、タンパク質の量の測定が、免疫組織化学法によって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 12】

Lamp-1 をコードする遺伝子の発現レベルを請求項 1 から請求項 11 のいずれか 1 項に従って測定するのに必要な試薬を含むことを特徴とする、AD の診断および / または予後診断のためのキット。

【請求項 13】

請求項 1 に記載のヒトの AD の診断および / または予後診断方法であって、Lamp-1 をコードする遺伝子の発現レベルの測定が、前記遺伝子でコードされる mRNA またはタンパク質に特異的に結合する指示物質によって実施されることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のヒトの AD の診断および / または予後診断方法であって、Lamp-1 の発現レベルが、画像によって測定されることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 13 から請求項 14 のいずれか 1 項に記載のヒトの AD の診断および / または予後診断のためのキットであって、遺伝子 Lamp-1 でコードされる RNA またはタンパク質に特異的に結合するレポーター物質、および生理学上許容される担体液を含有する組成物を含み、前記レポーター物質が、検出方法によって検出できる標識で標識されることを特徴とするキット。

【請求項 16】

ヒトの AD の診断のための遺伝子マーカーとしての Lamp-1 をコードする少なくとも 1 種の遺伝子の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000255

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																	
C07K 14/705 (2006.01)																	
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) C07K																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	WO 2000/066617 A1 (THE NATHAN S. KLINE INSTITUTE FOR PSYCHIATRIC RESEARCH) 09.11.2000, pages 1, 2; page 8 - page 13, line 7; page 16, line 15 - page 18, line 13; page 21, lines 1-6.	1-18															
X	CATALDO, A. M., HAMILTON, D. J., NIXON, R. A. Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. Brain Research. 1994, Vol. 640, pages 68-80. ISSN 0006-8993.	1, 4, 7-17															
Y		2, 3, 5, 6, 18															
Y	US 6759189 B1 (MEIKLE et al.) 06.07.2004, column 1; column 2, line 44 - column 3, line 5; column 3, lines 44 - 62, examples 4, 5, 6, 7, 10.	2, 3, 5, 6, 18															
A		1, 4, 7-17															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 30%;">"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</td> <td style="width: 10%;">"T"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"X"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means</td> <td>"Y"</td> <td>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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> </table>			"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			"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"	document member of the same patent family
"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																	
"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)	"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															
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art															
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"	document member of the same patent family															
Date of the actual completion of the international search 29 September 2006 (29.09.2006)		Date of mailing of the international search report (11-10-2006)															
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304		Authorized officer E. Relaño Reyes Telephone No. + 34 91 3498504															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000255

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

(see additional sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000255

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The present invention concerns the diagnosis and/or prognosis of Alzheimer's disease by means of determining a lysosomal marker.

The unique general concept underlying the present application is therefore the link between the ailment and the development of Alzheimer's disease and an increase in the number of lysosomes. The search has revealed that the unique general concept is known, since documents D01 and D02 reveal that people suffering from Alzheimer's have an increased number of lysosomes.

Since the unique general concept is known, it cannot be inventive and therefore it does not meet the requirements of PCT Rule 13.1. In addition, as there are no other features which could be regarded as special technical features in the sense of PCT Rule 13.2, the application lacks unity of invention.

The following groups of invention can therefore be distinguished:

- First invention: method for the diagnosis and/or prognosis of Alzheimer's disease, consisting in measuring Lamp-1 expression and in the kit for the determination thereof (part of claims 1 and 4 to 18, as well as claim 2);**
- Second invention: method for the diagnosis and/or prognosis of Alzheimer's disease, consisting in measuring Lamp-2 expression and in the kit for the determination thereof (part of claims 1 and 4 to 18; claim 3).**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES 2006/000255

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2000/066617 A1	09.11.2000	AU 4686300 A JP 2003514216 T AU 784048 B2 US 7090987 B1	17.11.2000 15.04.2003 19.01.2006 15.08.2006
US 6759189 B1	06.07.2004	WO1997/044668 A1 AU 2686997 A AU 714818 B NZ 332641 A IL 127033 A JP 2001519894 T US 2004191847 A1 JP 2006061161 A	27.11.1997 09.12.1997 13.01.2000 26.05.2000 06.12.2000 23.10.2001 30.09.2004 09.03.2006

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES 2006/000255

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
C07K 14/705 (2006.01)		
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)		
C07K		
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)		
CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 2000/066617 A1 (THE NATHAN S. KLINE INSTITUTE FOR PSYCHIATRIC RESEARCH) 09.11.2000, páginas 1, 2; página 8 - página 13, línea 7; página 16, línea 15 - página 18, línea 13; página 21, líneas 1-6.	1-18
X	CATALDO, A. M., HAMILTON, D. J., NIXON, R. A.	1, 4, 7-17
Y	Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. Brain Research. 1994, Vol. 640, páginas 68-80. ISSN 0006-8993.	2, 3, 5, 6, 18
Y	US 6759189 B1 (MEIKLE et al.) 06.07.2004, columna 1; columna 2, línea 44 - columna 3, línea 5; columna 3, líneas 44 - 62, ejemplos 4, 5, 6, 7, 10.	2, 3, 5, 6, 18
A		1, 4, 7-17
<input type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo		
* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional	
29 Septiembre 2006 (29.09.2006)	11 octubre 2006 (11-10-2006)	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado	
O.E.P.M.	E. Relaño Reyes	
Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.	Nº de teléfono + 34 91 3498504	
Nº de fax 34 91 3495304		

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2006/000255

Recuadro II	Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)
<p>Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones por los siguientes motivos:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Las reivindicaciones n°s: se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Las reivindicaciones n°s: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Las reivindicaciones n°s: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).</p>	
Recuadro III	Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)
<p>La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber: (ver página complementaria)</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:</p> <p>Indicación en cuanto a la protesta</p> <p><input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.</p> <p><input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.</p> <p><input type="checkbox"/> El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.</p>	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2006/000255

La presente invención se refiere al diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer mediante la determinación de algún marcador lisosomal.

El concepto general único que subyace en la presente solicitud es, por tanto, la relación entre el padecimiento y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y un incremento en la cantidad de lisosomas. La búsqueda ha revelado que el concepto general único es conocido, ya que los documentos D01 y D02 divulgan que en los enfermos de Alzheimer se produce un aumento del número de lisosomas.

Como dicho concepto general único es conocido, no puede ser inventivo y, por ello, no se cumplen los requisitos de la Regla 13.1 PCT. Además, como tampoco se encuentran otras características que puedan considerarse como elementos técnicos particulares en el sentido de la Regla 13.2 PCT, existe falta de unidad de invención.

Así, se distinguen los siguientes grupos de invenciones:

- Primera invención: método para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende la medición de la expresión de Lamp-1 y el kit para su determinación (parte de las reivindicaciones 1 y de la 4 a la 18, así como la reivindicación 2).
- Segunda invención: método para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende la medición de la expresión de Lamp-2 y el kit para su determinación (parte de las reivindicaciones 1 y de la 4 a la 18; reivindicación 3).

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2006/000255

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2000/066617 A1	09.11.2000	AU 4686300 A JP 2003514216 T AU 784048 B2 US 7090987 B1	17.11.2000 15.04.2003 19.01.2006 15.08.2006
US 6759189 B1	06.07.2004	WO1997/044668 A1 AU 2686997 A AU 714818 B NZ 332641 A IL 127033 A JP 2001519894 T US 2004191847 A1 JP 2006061161 A	27.11.1997 09.12.1997 13.01.2000 26.05.2000 06.12.2000 23.10.2001 30.09.2004 09.03.2006

フロントページの続き

(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, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, 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

(72)発明者 バラチナ カスティーリョ マルタ
 スペイン マドリッド ポスエロ デ アラルコン エディフィシオ 1 カミノ デ ラス ウ
 エルタス ヌメロ 2

(72)発明者 スピラダ ソレ フランシスコ
 スペイン マドリッド ポスエロ デ アラルコン エディフィシオ 1 カミノ デ ラス ウ
 エルタス ヌメロ 2

(72)発明者 デュラニー トルク オルガ マリア
 スペイン マドリッド ポスエロ デ アラルコン エディフィシオ 1 カミノ デ ラス ウ
 エルタス ヌメロ 2

(72)発明者 ブエサ アルホル カルロス マヌエル
 スペイン マドリッド ポスエロ デ アラルコン エディフィシオ 1 カミノ デ ラス ウ
 エルタス ヌメロ 2

(72)発明者 マエス タマラ
 スペイン マドリッド ポスエロ デ アラルコン エディフィシオ 1 カミノ デ ラス ウ
 エルタス ヌメロ 2

Fターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ03 QR08 QR32 QR56 QR62 QR84 QS25 QS34
 QX02

专利名称(译)	诊断阿尔茨海默病的方法		
公开(公告)号	JP2008544242A	公开(公告)日	2008-12-04
申请号	JP2008516347	申请日	2006-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	国际泳联BIOTECH.S Lü		
申请(专利权)人(译)	菲娜生物皇家社会Rimitada统一的个人		
[标]发明人	フェレルアビサンダイシドロ バラチナカステイーリヨマルタ スピラダソレフランシスコ デュラニートルクオルガマリア ブエサルホルカルロスマヌエル マエスタマラ		
发明人	フェレル アビサンダ イシドロ バラチナ カステイーリヨ マルタ スピラダ ソレ フランシスコ デュラニートルク オルガ マリア ブエサ アルホル カルロス マヌエル マエス タマラ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/6896 C07K14/4711 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/158 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	吉田健治 石田 纯		
优先权	2005001469 2005-06-16 ES		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及阿尔茨海默病的诊断和/或预后的方法，包括确定编码溶酶体标记的基因的表达水平。

