

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6338530号  
(P6338530)

(45) 発行日 平成30年6月6日(2018.6.6)

(24) 登録日 平成30年5月18日(2018.5.18)

(51) Int. Cl.			F I		
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	A
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2018.01)</b>	C 1 2 Q	1/68	Z N A A
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N	33/53	D
<b>C O 7 K</b>	<b>16/24</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	16/24	

請求項の数 32 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2014-541330 (P2014-541330)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成24年11月9日 (2012.11.9)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2014-533949 (P2014-533949A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
(43) 公表日	平成26年12月18日 (2014.12.18)		サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/064466		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W02013/071119	(74) 代理人	100109726
(87) 国際公開日	平成25年5月16日 (2013.5.16)		弁理士 園田 吉隆
審査請求日	平成27年11月9日 (2015.11.9)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	61/558,197		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成23年11月10日 (2011.11.10)	(72) 発明者	ペーレンズ, ティモシー ダブリュ.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(31) 優先権主張番号	61/671,531		80, サウス サンフランシスコ, デ
(32) 優先日	平成24年7月13日 (2012.7.13)		イーエヌエー ウェイ 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病を治療、診断、および監視するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における A D の若年齢の発病の危険性の増加を同定または予知するための方法であって、

( a ) 該対象からの試料を、遺伝的変異の存在または非存在を検出することができる試薬と接触させることであって、該遺伝的変異が、I L 6 R のアミノ酸配列 (配列番号 1 ) 内のアミノ酸置換 D 3 5 8 A をもたらす、接触させることと、

( b ) 該遺伝的変異の存在または非存在を決定することであって、該遺伝的変異の存在が、該対象が A D に罹患しているか、または A D を発症する危険性があることを示す、決定することと、および

( c ) 該試料における少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在を検出することと、を含み、

該遺伝的変異の存在が、少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在と一緒にになると、少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子を有し、該遺伝的変異の存在を欠く対象と比較して、該対象における A D の若年齢の発病の危険性の増加を示す、方法。

【請求項 2】

遺伝的変異が、S N P である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

遺伝的変異が、r s 2 2 2 8 1 4 5 における「C」対立遺伝子である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

試薬が、オリゴヌクレオチド、DNAプローブ、RNAプローブ、およびリボザイムから選択される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

試薬が、標識される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

試薬が、前記遺伝的変異を含む I L 6 R に特異的に結合する抗体である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

試料が、脳脊髄液、血液、血清、痰、唾液、粘膜剥離物、組織検体、涙腺分泌物、精液、または汗のうちの 1 つから選択される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 8】

ステップ ( b ) および / または ( c ) の結果が対象の A D を治療するための基礎として考慮される、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記対象を、1 つ以上の追加の遺伝子マーカーをスクリーニングする A D に関する 1 つ以上の追加の検出試験に供することをさらに含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

試料を分析して、A P O E 修飾因子である少なくとも 1 つの追加の遺伝子マーカーの存在を検出することをさらに含み、該少なくとも 1 つの追加の遺伝子マーカーが、I L 6 R をコードする遺伝子、N T F 4 をコードする遺伝子、U N C 5 C をコードする遺伝子、および表 3 に列挙される遺伝子から選択される遺伝子内にある、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 11】

少なくとも 1 つの追加の遺伝子マーカーが、I L 6 R のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) 内のアミノ酸置換 D 3 5 8 A をもたらす S N P、N T F 4 のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) 内のアミノ酸置換 R 2 0 6 W をもたらす S N P、および U N C 5 C のアミノ酸配列 ( 配列番号 3 ) 内のアミノ酸置換 T 8 3 5 W をもたらす S N P、または表 3 に列挙される S N P である、請求項 10 に記載の方法。

30

## 【請求項 12】

A D の若年齢の発病の危険性が増加している対象を同定する方法であって、  
該対象からの生体試料中の遺伝的変異の存在もしくは非存在を決定することであって、  
該遺伝的変異が、I L 6 R のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) 内のアミノ酸置換 D 3 5 8 A をもたらす、決定することと、

少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在または非存在を決定することと、  
を含み、

該遺伝的変異および少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在が、該遺伝的変異および少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在を欠く対象と比較して、該対象の A D の若年齢の発病の危険性が増加していることを示す、方法。

40

## 【請求項 13】

対象におけるアルツハイマー病 ( A D ) の若年齢の発病の危険性の増加を同定または予知する方法であって、

( a ) 該対象からの試料を、I L 6 R のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) 内のアミノ酸置換 D 3 5 8 A をもたらす S N P の存在または非存在を検出することができる試薬と接触させることと、

( b ) 該試料を分析して、前記 S N P の存在を検出することであって、該試料中の前記 S N P の存在が、該対象が A D に罹患しているか、または A D を発症する危険性があることを示す、検出することと、および

( c ) 該試料における少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在を検出するこ

50

とと、を含み、

前記SNPの存在が、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子の存在と一緒に  
、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有し、前記SNPの存在を欠く対象と  
比較して、該対象におけるADの若年齢の発病の危険性の増加を示す、方法。

【請求項14】

表3に列挙されるSNPから選択される1つ以上のSNPを検出することをさらに含む  
、請求項1、12および13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

少なくとも1つのオリゴヌクレオチド検出試薬および少なくとも1つのAPOE - 4  
対立遺伝子の存在を検出するための試薬を含み、該オリゴヌクレオチド検出試薬が、前記  
1つ以上のSNPにおける少なくとも2つの異なる対立遺伝子のそれぞれを区別する、請  
求項1、12および13のいずれか一項に記載の方法を実行するためのキット。

10

【請求項16】

検出が、直接配列決定、対立遺伝子特異的プローブハイブリダイゼーション、対立遺  
伝子特異的プライマー伸長、対立遺伝子特異的増幅、配列決定、5'ヌクレアーゼ分解、分  
子指標検定、オリゴヌクレオチド結紮検定、サイズ分析、および一本鎖高次構造多型から  
なる群から選択される過程により実行される、請求項15に記載のキット。

【請求項17】

オリゴヌクレオチド検出試薬が、基質に固定化される、請求項15または16に記載の  
キット。

20

【請求項18】

オリゴヌクレオチド検出試薬が、一列に配置される、請求項17に記載のキット。

【請求項19】

対象におけるアルツハイマー病(AD)の若年齢の発病の危険性の増加を同定または予  
知する方法であって、

(a) 該対象からの試料を、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換  
D358Aの存在または非存在を検出することができる試薬と接触させることと、

(b) 該試料を分析して、前記アミノ酸置換の存在を検出することであって、該試料中  
の前記アミノ酸置換の存在が、該対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危  
険性があることを示す、検出することと、および

30

(c) 該試料における少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子の存在を検出するこ  
とと、を含み、

前記アミノ酸置換の存在が、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子の存在と一緒に  
なると、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有し、前記アミノ酸置換の存在を  
欠く対象と比較して、該対象におけるADの若年齢の発病の危険性の増加を示す、方法。

【請求項20】

少なくとも1つの抗体検出試薬および少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子の存  
在を検出するための試薬を含み、該抗体検出試薬が、1つ以上のアミノ酸置換における少  
なくとも2つの異なるアミノ酸のそれぞれを区別する、請求項19に記載の方法を実行す  
るためのキット。

40

【請求項21】

対象におけるADの若年齢の発病の危険性の増加を同定または予知するためのキットで  
あって、遺伝的変異の存在または非存在を検出するための試薬、並びに少なくとも1つの  
APOE - 4対立遺伝子の存在を検出するための試薬を含み、ここで、該遺伝的変異は  
、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358Aをもたらし、

該遺伝的変異の存在が、該対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性  
があることを示し、且つ該遺伝的変異の存在が、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺  
伝子の存在と一緒になると、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有し、該遺  
伝的変異の存在を欠く対象と比較して、該対象におけるADの若年齢の発病の危険性  
の増加を示す、キット。

50

## 【請求項 2 2】

遺伝的変異が、SNPである、請求項 2 1 に記載のキット。

## 【請求項 2 3】

遺伝的変異が、rs 2 2 2 8 1 4 5 における「C」対立遺伝子である、請求項 2 1 または 2 2 に記載のキット。

## 【請求項 2 4】

試薬が、オリゴヌクレオチド、DNAプローブ、RNAプローブ、およびリボザイムから選択される、請求項 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 2 5】

試薬が、標識される、請求項 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載のキット。

10

## 【請求項 2 6】

遺伝的変異の存在または非存在を検出するための試薬が、前記遺伝的変異を含む IL 6 R に特異的に結合する抗体である、請求項 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 2 7】

試料が、脳脊髄液、血液、血清、痰、唾液、粘膜剥離物、組織検体、涙腺分泌物、精液、または汗のうちの 1 つから選択される、請求項 2 1 から 2 6 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 2 8】

遺伝的変異の存在または非存在の検出、および/または少なくとも 1 つの APOE - 4 対立遺伝子の存在の検出の結果が、対象の AD を治療するための基礎として考慮される、請求項 2 1 から 2 7 のいずれか一項に記載のキット。

20

## 【請求項 2 9】

キットが 1 つ以上の追加の遺伝子マーカーをスクリーニングする AD に関する検出試験のための 1 つ以上の追加の試薬をさらに含むか、あるいは対象が、精神状態の検査を施されるか、もしくは撮像法に供される、請求項 2 1 から 2 8 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 3 0】

試料を分析して、APOE 修飾因子である少なくとも 1 つの追加の遺伝子マーカーの存在を検出するための試薬をさらに含み、該少なくとも 1 つの追加の遺伝子マーカーが、IL 6 R をコードする遺伝子、NTF 4 をコードする遺伝子、UNC 5 C をコードする遺伝子、および表 3 に列挙される遺伝子から選択される遺伝子内にある、請求項 2 1 から 2 8 のいずれか一項に記載のキット。

30

## 【請求項 3 1】

少なくとも 1 つの追加の遺伝子マーカーが、IL 6 R のアミノ酸配列（配列番号 1）内のアミノ酸置換 D 3 5 8 A をもたらす SNP、NTF 4 のアミノ酸配列（配列番号 2）内のアミノ酸置換 R 2 0 6 W をもたらす SNP、および UNC 5 C のアミノ酸配列（配列番号 3）内のアミノ酸置換 T 8 3 5 W をもたらす SNP、または表 3 に列挙される SNP である、請求項 3 0 に記載のキット。

## 【請求項 3 2】

AD の若年齢の発病の危険性が増加している対象を同定するためのキットであって、該対象からの生体試料中の遺伝的変異の存在もしくは非存在を決定するための試薬、並びに少なくとも 1 つの APOE - 4 対立遺伝子の存在を決定するための試薬を含み、ここで、該遺伝的変異は、IL 6 R のアミノ酸配列（配列番号 1）内のアミノ酸置換 D 3 5 8 A をもたらし、

40

該遺伝的変異および少なくとも 1 つの APOE - 4 対立遺伝子の存在が、該遺伝的変異および少なくとも 1 つの APOE - 4 対立遺伝子の存在を欠く対象と比較して、該対象の AD の若年齢の発病の危険性が増加していることを示す、キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

50

アルツハイマー病（AD）のある特定の亜表現型を含む、ADを識別、診断、および予知する方法、ならびに患者のある特定の亜集団を含む、ADを治療する方法が提供される。また有効なAD治療薬を識別し、AD治療薬に対する反応性を予測するための方法も提供される。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病（AD）は、認知および記憶機能の進行性喪失、および最終的に認知症と関連付けられる中枢神経系の神経変性疾患である。ADは、先進国における認知症の最上位の、かつ最も一般的な原因であり、認知症の全症例の60%以上を占める。生検ではAD患者において2つの病理学的特徴：海馬、大脳皮質、および認知機能に必須の脳の他の領域内の細胞外プラークおよび細胞内もつれが観測される。プラークは主に、アミロイド前駆体タンパク質（APP）に由来するペプチドである、アミロイド（A $\beta$ ）の堆積から形成される。

10

【0003】

ADの頻度は、成人期の10年毎に増加し、85歳以上の集団の20~40%に達する。ますます多くの人々が80歳代および90歳代まで生きるため、患者の数は、次の20年間で3倍になると予想される。米国では500万超の人々がADに罹患し、年間800,000件の死亡がADと関連付けられている。2011年に、AD患者の介護にかかる費用は、総額1,830億ドルになると推定される。またADは、家族および介護者に重い精神的負担を課す（米国では約1,490万人がAD患者の介護をしている）。AD患者は、診断後平均7~10年生き、在宅または養護施設のいずれかでの介護下で平均5年を過ごす。

20

【0004】

早発型アルツハイマー病（EOAD）は、希少形態のアルツハイマー病であり、個人は65歳前に疾患を診断される。全アルツハイマー病患者の10%未満がEOADを有する。EOAD症例の約半数が家族性であり、疾患の遺伝は常染色体優性形式に従う。明らかな遺伝形式が見出されないAD症例は、「散発性」と呼ばれる。これまでに、家族性EOADを持つ家族において、染色体21上のアミロイド前駆体タンパク質（APP）、染色体14上のプレセニリン1（PSEN1）、および染色体1上のプレセニリン2（PSEN2）を含む3つの遺伝子内の突然変異が識別されている。APPおよびプレセニリン遺伝子内の病理性突然変異の大部分は、APPの異常な処理と関連付けられ、アミロイドプラーク中の主成分であるA $\beta$ 42の生成の増加をもたらす。

30

【0005】

遅発型アルツハイマー病（LOAD）は、アルツハイマー病の最も一般的な形態であり、症例の約90%を占め、通常65歳以降に発生する。LOADは、85歳以上の全個人のほぼ半数を襲い、典型的に散発性である。双生児研究に基づいて、疾患の遺伝率は79%と推定されており、男女間では有病率または遺伝率に（年齢調整後の）差はない（Gatz, et al., Arch. Gen. Psychiatry, 63:168-74 (2006)）。これまでに早発型アルツハイマー病と関連付けられるとして識別される単一遺伝子の突然変異は、遅発型アルツハイマーに関与しているとは思われない。

40

【0006】

ADの遅発型形態を引き起こす特定の遺伝子は見出されていないが、その疾患を発症する個人の危険性を増大させる1つの遺伝的危険因子は、染色体19上で見出されるアポリポタンパク質E（APOE）遺伝子に関連する。ADに関する以前の遺伝学的研究は、APOE遺伝子を含む染色体19上の同一領域との関係および関連を証明した（Schellenberg, et al., J. Neurogenet., 4:97-108 (1987); Pericak-Vance, et al., Am. J. Hum. Gen., 48:1034-1050 (1991)）。APOE遺伝子は、 $\epsilon$ 2、 $\epsilon$ 3、および $\epsilon$ 4と指定される、3つの一般的な対立遺伝子を有する。一般的な $\epsilon$ 3対立遺伝子と比較して、 $\epsilon$ 4対立遺伝子は、ADの危険性を増大させるが、 $\epsilon$ 2は、ADの危険性を減少させる（

50

Corder, et al. (1993) Science, 281: 921 - 923; Corder et al. (1994) Nat. Genet. 7: 180 - 184)。母集団の場合、85歳までのADの生涯リスク(LTR)は11~14%であるが、APOE 3/4保有者の場合、LTRは23~35%、APOE 4/4保有者の場合は51~68%に上昇する(Genin et al. (2011) Molecular Psychiatry 16: 903 - 907)。APOE 2/4保有者のAD危険性は、中立遺伝子型APOE 3/3を有する対象の場合と同じであるが、APOE 2/3保有者は、危険性が減少する。AD患者の40~65%は、APOE - 4対立遺伝子の少なくとも1つの複製を有するが、APOE - 4は、AD患者の少なくとも3分の1が、APOE - 4陰性であり、いくつかのAPOE - 4ホモ接合体は、決して疾患を発症しないため、疾患の必要決定因子ではない。したがって、この対立遺伝子だけでは、ADの診断に十分でない(Ertekin-Taner (2007) Neurol. Clin. 25: 811)。

10

#### 【0007】

現在、ADを診断する主流の方法は、詳細な患者の病歴を取ることと、記憶および心理検査を行うことと、一時的(例えば、うつ病もしくはビタミンB12欠乏症)または永久的(例えば、脳卒中)な状態を含む、記憶喪失についての他の説明を除外することを伴う。この手法の下では、死後、検死により疾患の特徴である患者の脳内のアミロイドプラークおよび神経原線維のもつれが明らかになるまで、ADを決定的に診断することはできない。さらに、臨床診断手順は、患者が著しい、異常な記憶喪失または人格変化を示し始めた後のみに役立つ。それまで、患者は何年もADを有していた可能性がある。例えば、医師がADを疾患過程の早期に識別するか、または疾患を発症する危険性の高い個人を識別することができる診断検査は、疾患過程の早期段階で介入するためのオプションを提供する。疾患過程における早期介入は、一般に、後期介入と比較して、疾患の発生または進行を遅らせることにより、より良好な治療結果をもたらす。したがって、ADを診断する、およびその診断を補助する他の方法の必要性がある。

20

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

本発明は、対象におけるアルツハイマー病(AD)の診断および予知の方法を提供し、この方法は、対象からの試料中の1つ以上の遺伝的変異の存在または非存在を検出することを含み、遺伝的変異の存在は、本明細書に開示されるように、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。

30

#### 【0009】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有する対象におけるADの発症に対して有害または有益な影響を有する遺伝的変異をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、75歳以上のADのない、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有する対照対象と比較して、65歳未満のADを有し、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有する対象において、増加または減少した頻度で存在する遺伝的変異を識別することを含み、対照対象と比較して、ADを有する対象における頻度の増加は、遺伝的変異が、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有する対象における有害な影響と関連付けられることを示し、対照対象と比較して、ADを有する対象における頻度の減少は、遺伝的変異が、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有する対象における有益な影響と関連付けられることを示す。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、ゲノム全領域関連走査を用いて識別される。

40

#### 【0010】

本発明はさらに、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有する対象におけるADの発症に対して有害または有益な影響を有する遺伝的変異をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、(a) 65歳未満のADを有し、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有する複数の対象の1つ以上の遺伝子座における遺伝子型を決定することと、(b) 75歳以上のADを有しないが、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を

50

有する複数の対照対象の1つ以上の遺伝子座における遺伝子型を決定することと、(c)対照対象と比較して、ADを有する対象において、増加または減少した頻度で存在する遺伝的変異を識別することと、を含み、対照対象と比較して、ADを有する対象における頻度の増加は、遺伝的変異が、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有する対象における有害な影響と関連付けられることを示し、対照対象と比較して、ADを有する対象における頻度の減少は、遺伝的変異が、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有する対象における有益な影響と関連付けられることを示す。

【0011】

これらのスクリーニング法のいくつかの実施形態では、有害な影響は、ADを発症する危険性の増加である。いくつかの実施形態では、有害な影響は、ADの若年齢の発病である。いくつかの実施形態では、有益な影響は、ADを発症する危険性の減少である。いくつかの実施形態では、有益な影響は、ADの高年齢の発病である。

10

【0012】

一実施形態では、本発明は、対象におけるアルツハイマー病(AD)を示す遺伝的変異の存在または非存在を検出するための方法を提供し、この方法は、(a)対象からの試料を、IL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される遺伝子、またはその遺伝子産物内の遺伝的変異の存在または非存在を検出することができる試薬と接触させることと、(b)遺伝的変異の存在または非存在を決定することと、を含み、遺伝的変異の存在が、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。

20

【0013】

様々な実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異は、一塩基多型(SNP)、対立遺伝子、ハプロタイプ、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、SNPである。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内でアミノ酸置換D358AをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、rs2228145における「C」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内でアミノ酸置換R206WをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、rs121918427における「T」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内でアミノ酸置換T835MをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、UNC5C(配列番号3)の835位のアミノ酸をコードするコドン内で、AをGに置換するSNPである。

30

【0014】

他の実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異は、アミノ酸置換、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、アミノ酸置換である。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358Aである。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内のアミノ酸置換R206Wである。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のアミノ酸置換T835Mである。

【0015】

この方法のいくつかの実施形態では、試薬は、オリゴヌクレオチド、DNAプローブ、RNAプローブ、およびリボザイムから選択される。他の実施形態では、試薬は、遺伝的変異を含むタンパク質に特異的に結合する抗体である。いくつかの実施形態では、試薬は標識される。

40

【0016】

この方法のいくつかの実施形態では、試料は、脳脊髄液、血液、血清、痰、唾液、粘膜剥離物、組織検体、涙腺分泌物、精液、または汗のうちの1つから選択される。

【0017】

一実施形態では、この方法は、ステップ(b)の結果に基づいて、対象のADを治療することをさらに含む。一実施形態では、この方法は、試料中で少なくとも1つのAPOE

50

- 4対立遺伝子の存在を検出することをさらに含む。一実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異の存在は、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子の存在と一緒にになると、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有し、少なくとも1つの遺伝子変異の存在を欠く対象と比較して、ADの若年齢診断の危険性の増加を示す。

【0018】

本発明はさらに、対象におけるアルツハイマー病(AD)を示す遺伝的変異を検出するための方法を提供し、この方法は、対象からの生体試料中のIL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される遺伝子、またはその遺伝子産物内の遺伝的変異の存在もしくは非存在を決定することを含み、遺伝的変異の存在が、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。

10

【0019】

様々な実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異は、一塩基多型(SNP)、対立遺伝子、ハプロタイプ、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、SNPである。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内でアミノ酸置換D358AをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、rs2228145における「C」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内でアミノ酸置換R206WをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、rs121918427における「T」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内でアミノ酸置換T835MをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、UNC5C(配列番号3)の835位のアミノ酸をコードするコドン内で、AをGに置換するSNPである。

20

【0020】

他の実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異は、アミノ酸置換、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、アミノ酸置換である。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358Aである。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内のアミノ酸置換R206Wである。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のアミノ酸置換T835Mである。

【0021】

この方法の様々な実施形態では、1つ以上の遺伝的変異の存在の検出は、直接配列決定、対立遺伝子特異的プローブハイブリダイゼーション、対立遺伝子特異的プライマー伸長、対立遺伝子特異的増幅、対立遺伝子特異的ヌクレオチドの取り込み、5'ヌクレアーゼ分解、分子指標検定、オリゴヌクレオチド結紮検定、サイズ分析、および一本鎖高次構造多型からなる群から選択される過程により実行される。いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝的変異の存在を決定する前に、試料からの核酸が増幅される。

30

【0022】

この方法の他の実施形態では、タンパク質中の1つ以上の遺伝的変異の存在の検出は、電気泳動、クロマトグラフィー、質量分析、タンパク質分解、タンパク質配列決定、免疫親和性検定、またはこれらの組み合わせから選択される過程により実行される。いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝的変異の存在を決定する前に、タンパク質を結合する抗体またはペプチドを用いて、試料からのタンパク質が精製される。

40

【0023】

この方法のいくつかの実施形態では、試料は、脳脊髄液、血液、血清、痰、唾液、粘膜剥離物、組織検体、涙腺分泌物、精液、または汗のうちの1つから選択される。

【0024】

一実施形態では、この方法は、ステップ(b)の結果に基づいて、対象のADを治療することをさらに含む。一実施形態では、この方法は、試料中で少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子の存在を検出することをさらに含む。一実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異の存在は、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子の存在と一緒になる

50



と、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有し、少なくとも1つの遺伝子マーカーの存在を欠く対象と比較して、ADの若年齢診断の危険性の増加を示す。

【0025】

本発明はさらに、対象におけるADを診断または予知するための方法を提供し、この方法は、(a)対象からの試料を、IL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される遺伝子、またはその遺伝子産物内の遺伝的変異の存在または非存在を検出することができる試薬と接触させることと、(b)遺伝的変異の存在または非存在を決定することと、を含み、遺伝的変異の存在が、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。

【0026】

様々な実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異は、一塩基多型(SNP)、対立遺伝子、ハプロタイプ、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、SNPである。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内でアミノ酸置換D358AをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、rs2228145における「C」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内でアミノ酸置換R206WをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、rs121918427における「T」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内でアミノ酸置換T835MをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、UNC5C(配列番号3)の835位のアミノ酸をコードするコドン内で、AをGに置換するSNPである。

【0027】

他の実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異は、アミノ酸置換、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、アミノ酸置換である。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358Aである。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内のアミノ酸置換R206Wである。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のアミノ酸置換T835Mである。

【0028】

この方法のいくつかの実施形態では、試薬は、オリゴヌクレオチド、DNAプローブ、RNAプローブ、およびリボザイムから選択される。他の実施形態では、試薬は、遺伝的変異を含むタンパク質に特異的に結合する抗体である。いくつかの実施形態では、試薬は標識される。

【0029】

この方法のいくつかの実施形態では、試料は、脳脊髄液、血液、血清、痰、唾液、粘膜剥離物、組織検体、涙腺分泌物、精液、または汗のうちの1つから選択される。

【0030】

一実施形態では、この方法は、ステップ(b)の結果に基づいて、対象のADを治療することをさらに含む。一実施形態では、この方法は、試料中で少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子の存在を検出することをさらに含む。一実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異の存在は、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子の存在と一緒にになると、少なくとも1つのAPOE - 4対立遺伝子を有し、少なくとも1つの遺伝子マーカーの存在を欠く対象と比較して、ADの若年齢診断の危険性の増加を示す。

【0031】

いくつかの実施形態において、本方法は、対象を、1つ以上の追加の遺伝子マーカーをスクリーニングすること、精神状態の検査を行うこと、または対象を撮像法に供することからなる群から選択される、ADに関する1つ以上の追加の診断試験に供することをさらに含む。

【0032】

いくつかの実施形態において、この方法は、試料を分析して、APOE修飾因子である

10

20

30

40

50

少なくとも1つの追加の遺伝子マーカーの存在を検出することをさらに含み、少なくとも1つの追加の遺伝子マーカーは、IL6Rをコードする遺伝子、NTF4をコードする遺伝子、UNC5Cをコードする遺伝子、および表3に列挙される遺伝子から選択される遺伝子内にある。様々な実施形態では、少なくとも1つの追加の遺伝子マーカーは、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358AをもたらすSNP、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内のアミノ酸置換R206WをもたらすSNP、およびUNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のアミノ酸置換T835WをもたらすSNP、または表3に列挙されるSNPである。

**【0033】**

本発明はさらに、対象におけるADを診断または予知する方法を提供し、この方法は、対象からの生体試料中のIL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される遺伝子、またはその遺伝子産物内の遺伝的変異の存在もしくは非存在を決定することを含み、遺伝的変異の存在が、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。

10

**【0034】**

様々な実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異は、一塩基多型(SNP)、対立遺伝子、ハプロタイプ、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、SNPである。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内でアミノ酸置換D358AをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、rs2228145における「C」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内でアミノ酸置換R206WをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、rs121918427における「T」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内でアミノ酸置換T835MをもたらすSNPである。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、UNC5C(配列番号3)の835位のアミノ酸をコードするコドン内で、AをGに置換するSNPである。

20

**【0035】**

他の実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異は、アミノ酸置換、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、アミノ酸置換である。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358Aである。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内のアミノ酸置換R206Wである。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のアミノ酸置換T835Mである。

30

**【0036】**

この方法の様々な実施形態では、1つ以上の遺伝的変異の存在の検出は、直接配列決定、対立遺伝子特異的プローブハイブリダイゼーション、対立遺伝子特異的プライマー伸長、対立遺伝子特異的増幅、対立遺伝子特異的ヌクレオチドの取り込み、5'ヌクレアーゼ分解、分子指標検定、オリゴヌクレオチド結紮検定、サイズ分析、および一本鎖高次構造多型からなる群から選択される過程により実行される。いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝的変異の存在を決定する前に、試料からの核酸が増幅される。

40

**【0037】**

この方法の他の実施形態では、タンパク質中の1つ以上の遺伝的変異の存在の検出は、電気泳動、クロマトグラフィー、質量分析、タンパク質分解、タンパク質配列決定、免疫親和性検定、またはこれらの組み合わせから選択される過程により実行される。いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝的変異の存在を決定する前に、タンパク質を結合する抗体またはペプチドを用いて、試料からのタンパク質が精製される。

**【0038】**

この方法のいくつかの実施形態では、試料は、脳脊髄液、血液、血清、痰、唾液、粘膜剥離物、組織検体、涙腺分泌物、精液、または汗のうちの1つから選択される。

**【0039】**

50

一実施形態では、この方法は、ステップ ( b ) の結果に基づいて、対象の A D を治療することをさらに含む。一実施形態では、この方法は、試料中で少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在を検出することをさらに含む。一実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝的変異の存在は、少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在と一緒にいると、少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子を有し、少なくとも 1 つの遺伝子マーカーの存在を欠く対象と比較して、A D の若年齢診断の危険性の増加を示す。

#### 【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態において、この方法は、試料を分析して、A P O E 修飾因子である少なくとも 1 つの追加の遺伝子マーカーの存在を検出することをさらに含み、少なくとも 1 つの追加の遺伝子マーカーは、I L 6 R をコードする遺伝子、N T F 4 をコードする遺伝子、U N C 5 C をコードする遺伝子、および表 3 に列挙される遺伝子から選択される遺伝子内にある。様々な実施形態では、少なくとも 1 つの追加の遺伝子マーカーは、I L 6 R のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) 内のアミノ酸置換 D 3 5 8 A をもたらす S N P 、N T F 4 のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) 内のアミノ酸置換 R 2 0 6 W をもたらす S N P 、および U N C 5 C のアミノ酸配列 ( 配列番号 3 ) 内のアミノ酸置換 T 8 3 5 W をもたらす S N P 、または表 3 に列挙される S N P である。

#### 【 0 0 4 1 】

本発明はさらに、A D の若年齢の発病の危険性が増加した対象を識別する方法を提供し、この方法は、( a ) 対象からの生体試料中の I L 6 R 、N T F 4 、および U N C 5 C をコードする遺伝子から選択される遺伝子、またはその遺伝子産物内の遺伝的変異の存在もしくは非存在を決定することと、( b ) 少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在を決定することと、を含み、遺伝的変異および少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在が、遺伝的変異および少なくとも 1 つの A P O E - 4 対立遺伝子の存在を欠く対象と比較して、対象の A D の若年齢診断の危険性が増加したことを示す。

#### 【 0 0 4 2 】

様々な実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝的変異は、一塩基多型 ( S N P ) 、対立遺伝子、ハプロタイプ、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、S N P である。一実施形態では、遺伝的変異は、I L 6 R のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) 内でアミノ酸置換 D 3 5 8 A をもたらす S N P である。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、r s 2 2 2 8 1 4 5 における「 C 」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、N T F 4 のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) 内でアミノ酸置換 R 2 0 6 W をもたらす S N P である。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、r s 1 2 1 9 1 8 4 2 7 における「 T 」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、U N C 5 C のアミノ酸配列 ( 配列番号 3 ) 内でアミノ酸置換 T 8 3 5 M をもたらす S N P である。さらなる実施形態では、遺伝的変異は、U N C 5 C ( 配列番号 3 ) の 8 3 5 位のアミノ酸をコードするコドン内で、A を G に置換する S N P である。

#### 【 0 0 4 3 】

他の実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝的変異は、アミノ酸置換、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、アミノ酸置換である。一実施形態では、遺伝的変異は、I L 6 R のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) 内のアミノ酸置換 D 3 5 8 A である。一実施形態では、遺伝的変異は、N T F 4 のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) 内のアミノ酸置換 R 2 0 6 W である。一実施形態では、遺伝的変異は、U N C 5 C のアミノ酸配列 ( 配列番号 3 ) 内のアミノ酸置換 T 8 3 5 M である。

#### 【 0 0 4 4 】

この方法の様々な実施形態では、1 つ以上の遺伝的変異の存在の検出は、直接配列決定、対立遺伝子特異的プローブハイブリダイゼーション、対立遺伝子特異的プライマー伸長、対立遺伝子特異的増幅、対立遺伝子特異的ヌクレオチドの取り込み、5'ヌクレアーゼ分解、分子指標検定、オリゴヌクレオチド結紮検定、サイズ分析、および一本鎖高次構造多型からなる群から選択される過程により実行される。いくつかの実施形態では、1 つ以上の遺伝的変異の存在を決定する前に、試料からの核酸が増幅される。

## 【 0 0 4 5 】

この方法の他の実施形態では、タンパク質中の1つ以上の遺伝的変異の存在の検出は、電気泳動、クロマトグラフィー、質量分析、タンパク分解、タンパク質配列決定、免疫親和性検定、またはこれらの組み合わせから選択される過程により実行される。いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝的変異の存在を決定する前に、タンパク質を結合する抗体またはペプチドを用いて、試料からのタンパク質が精製される。

## 【 0 0 4 6 】

この方法のいくつかの実施形態では、試料は、脳脊髄液、血液、血清、痰、唾液、粘膜剥離物、組織検体、涙腺分泌物、精液、または汗のうちの1つから選択される。

## 【 0 0 4 7 】

本発明はさらに、対象におけるADの亜表現型の予知を補助する方法を提供し、この方法は、対象に由来する生体試料中で、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358AをもたらすSNPの存在を検出することを含み、ADの亜表現型は、1人以上の対照対象と比較して、対象に由来する生体試料中の可溶性IL6Rのレベルの増加により少なくとも部分的に特徴付けられる。

## 【 0 0 4 8 】

本発明はさらに、IL6Rを標的とするAD治療薬に対する対象の反応を予知する方法を提供し、この方法は、対象から得られた生体試料中で、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358AをもたらすSNPを検出することを含み、SNPの存在が、IL6Rを標的とする治療薬に対する反応を示す。一実施形態では、治療薬は、抗IL6R抗体である。

## 【 0 0 4 9 】

本発明はさらに、対象におけるADの亜表現型の予知を補助する方法を提供し、この方法は、対象に由来する生体試料中で、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内のアミノ酸置換R206WをもたらすSNPの存在を検出することを含み、ADの亜表現型が、1人以上の対照対象と比較して、対象に由来する生体試料中のTrkBの活性の減少により少なくとも部分的に特徴付けられる。

## 【 0 0 5 0 】

本発明はさらに、TrkBを標的とするAD治療薬に対する対象の反応を予知する方法を提供し、この方法は、対象から得られた生体試料中で、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内のアミノ酸置換R206WをもたらすSNPを検出することを含み、SNPの存在が、TrkBを標的とする治療薬に対する反応を示す。一実施形態では、治療薬は、TrkB作動薬である。

## 【 0 0 5 1 】

本発明はさらに、対象におけるADの亜表現型の予知を補助する方法を提供し、この方法は、対象に由来する生体試料中で、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のアミノ酸置換T835MをもたらすSNPの存在を検出することを含み、ADの亜表現型は、1人以上の対照対象と比較して、対象に由来する生体試料中のUNC5Cのアポトーシス活性の増加により少なくとも部分的に特徴付けられる。

## 【 0 0 5 2 】

本発明はさらに、UNC5Cを標的とするAD治療薬に対する対象の反応を予知する方法を提供し、この方法は、対象から得られた生体試料中で、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のアミノ酸置換T835MをもたらすSNPを検出することを含み、SNPの存在が、UNC5Cを標的とする治療薬に対する反応を示す。一実施形態では、治療薬は、UNC5C死ドメインを標的とする。

## 【 0 0 5 3 】

本発明はさらに、対象におけるアルツハイマー病(AD)を診断または予知する方法を提供し、この方法は、(a)対象からの試料を、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358AをもたらすSNP、NTF4のアミノ酸配列内のアミノ酸置換R206WをもたらすSNP、およびUNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のア

10

20

30

40

50

ミノ酸置換 T 8 3 5 M をもたらす SNP からなる群から選択される、1 つ以上の SNP の存在または非存在を検出することができる試薬と接触させることと、( b ) 試料を分析して、該 1 つ以上の SNP の存在を検出することと、を含み、試料中の 1 つ以上の SNP の存在が、対象が AD に罹患しているか、または AD を発症する危険性があることを示す。一実施形態では、この方法は、表 3 に列挙される SNP から選択される 1 つ以上の SNP を検出することをさらに含む。

【 0 0 5 4 】

本発明はさらに、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチド検出試薬を含む、この方法を実行するためのキットを提供し、オリゴヌクレオチド検出試薬は、1 つ以上の SNP における少なくとも 2 つの異なる対立遺伝子のそれぞれを区別する。様々な実施形態では、検出は、直接配列決定、対立遺伝子特異的プローブハイブリダイゼーション、対立遺伝子特異的プライマー伸長、対立遺伝子特異的増幅、配列決定、5'ヌクレアーゼ分解、分子指標検定、オリゴヌクレオチド結紮検定、サイズ分析、および一本鎖高次構造多型からなる群から選択される過程により実行される。

10

【 0 0 5 5 】

一実施形態では、オリゴヌクレオチド検出試薬は、基質に固定化される。さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチド検出試薬は、一列に配置される。

【 0 0 5 6 】

本発明はさらに、対象におけるアルツハイマー病 ( AD ) を診断または予知する方法を提供し、この方法は、( a ) 対象からの試料を、I L 6 R のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) 内のアミノ酸置換 D 3 5 8 A、N T F 4 のアミノ酸配列内のアミノ酸置換 R 2 0 6 W、および U N C 5 C のアミノ酸配列 ( 配列番号 3 ) 内のアミノ酸置換 T 8 3 5 M からなる群から選択される、1 つ以上のアミノ酸置換の存在または非存在を検出することができる試薬と接触させることと、( b ) 試料を分析して、該 1 つ以上のアミノ酸置換の存在を検出することと、を含み、試料中の 1 つ以上のアミノ酸置換の存在が、対象が AD に罹患しているか、または AD を発症する危険性があることを示す。

20

【 0 0 5 7 】

本発明はさらに、少なくとも 1 つの抗体検出試薬を含む、方法を実行するためのキットを提供し、抗体検出試薬は、1 つ以上のアミノ酸置換における少なくとも 2 つの異なるアミノ酸のそれぞれを区別する。本発明はさらに、少なくとも 1 つのペプチド検出試薬を含む、方法を実行するためのキットを提供し、ペプチド検出試薬は、1 つ以上のアミノ酸置換における少なくとも 2 つの異なるアミノ酸のそれぞれを区別する。

30

【 0 0 5 8 】

本発明はさらに、AD の治療のための治療標的を提供し、治療標的は、I L 6 R、N T F 4、および U N C 5 C から選択される遺伝子によりコードされるタンパク質のうちの 1 つ、またはそれらの組み合わせである。

【 0 0 5 9 】

本発明はさらに、AD を診断または予知するための一式の分子プローブを提供し、I L 6 R のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) 内のアミノ酸置換 D 3 5 8 A をもたらす SNP、N T F 4 のアミノ酸配列内のアミノ酸置換 R 2 0 6 W をもたらす SNP、および U N C 5 C のアミノ酸配列 ( 配列番号 3 ) 内のアミノ酸置換 T 8 3 5 M をもたらす SNP を含む群から選択される、少なくとも 2 つのマーカを直接または間接的に検出することができる少なくとも 2 つのプローブを含み、該分子プローブは、1 0 0 0 個を超える要素のマイクロアレイと関連付けられない。一実施形態では、一式の分子プローブは、表 3 に列挙される SNP から選択される少なくとも 2 つのマーカを直接または間接的に検出することができる 1 つ以上のプローブをさらに含む。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 0 】

【 図 1 】 A P O E 修飾因子スクリーニングで用いられる戦略を示す図である。

【 図 2 】 ヒト染色体 1 の一部分にわたる位置を示すマンハッタンプロットであり、AD 症

50

例試料対スーパー対照における遺伝的変異間に統計的に有意な差があった。p値が低いほど、関連が強くなる。

【図3】NIA/LOAD研究からの非選択アルツハイマー病症例(N=932個体)および対照(N=832個体)におけるrs4129267のT対立遺伝子の頻度、rs2228145のC対立遺伝子のプロキシを示す図である。マイナー対立遺伝子の頻度は、AD症例の発病年齢および対照の年齢により層別される。

【図4】TGENプロジェクトからのデータの分析を示す(Webster et al., (2009) Am. J. Hum. Genet. 84:445-458)図である。AD(Aβ)を持つ対象の脳内の膜結合性および可溶性IL6Rの両方の発現レベルを、IR6R(NM\_000565)の膜結合性形態のみを検出するプローブ、または膜結合性およびsIL6Rの両方を捕捉するプローブ(NM\_181359)のいずれかを用いて、対照(CN)と比較した。

【図5】LO1系統におけるノンパラメトリック連鎖分析の結果を示す図である。

【図6】アミノ酸残基T853の保存を示す、UNC5ファミリーメンバーのアミノ酸配列アラインメントを提供する図である。

【図7】ヒト染色体1の一部分にわたる位置を示すマンハッタンプロットを示す図であり、遺伝的変異と脳脊髄液中の可溶性IL6Rとの間に統計的に有意な差があった。p値が低いほど、関連が強くなる。

【図8】IL6RのD358またはA358構成体で形質転換され、100nMホルボールミリスチン酸酢酸塩(PMA)で0、30、60、または120分間処理された293T細胞中のIL6Rの相対膜結合率を示す図である。処理後細胞を採取し、IL6R-PE抗体で染色して、膜結合性IL6RをFACSにより分析した。

【図9】100nM PMAで60分間の処理前後のD358またはA358のいずれかにホモ接合性であった、年齢、性別、および人種が一致するドナーからのCD4<sup>+</sup>T細胞中の膜結合性IL6Rの割合を示す図である。処理直後に細胞を採取し、IL6R-PE抗体で染色して、膜結合性IL6RをFACSにより分析した。

【図10】D358またはA358のいずれかにホモ接合性であった、年齢、性別、および人種が一致するドナーからのヒトCD4<sup>+</sup>T細胞の可溶性IL6Rを示す図である。CD4<sup>+</sup>T細胞を抗CD3/抗CD28上に置き、24、48、および72時間後に総RNA抽出のために採取して、上清を回収してELISAによりsIL6Rレベルを決定した。グラフは、各時点における、D358に対してA358の可溶性IL6Rの倍率増加を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0061】

定義

本明細書において同義的に用いられる、用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、および/またはそれらの類似体、あるいはDNAもしくはRNAポリメラーゼによりポリマーに組み込むことができる任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびそれらの類似体等の修飾ヌクレオチドを含んでよい。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーの組立て前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断され得る。ポリヌクレオチドは、例えば標識成分との共役により、重合化後にさらに修飾され得る。他のタイプの修飾としては、例えば、天然に存在するヌクレオチドのうちの一つ以上を類似体と置換する「キャップ」、ヌクレオチド間修飾、例えば、非電荷性結合(例えば、メチルホスホン酸塩、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等)によるもの、および電荷性結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等)によるもの、例えば、タンパク質(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リシン等)の懸垂部分を含むもの、挿入剤(例えば、アクリジン、ソラーレン等)によるもの、キレート剤(例えば、金

属、放射活性金属、ホウ素、酸化金属等)によるもの、アルキル化剤を含むもの、修飾結合(例えば、アノマー核酸等)によるもの、ならびにポリヌクレオチド(複数可)の未修飾形態が挙げられる。さらに、糖内に通常存在するヒドロキシル基のうちのいずれかは、例えば、ホスホン酸基、リン酸基により置換されるか、標準保護基により保護されるか、もしくは活性化されて追加のヌクレオチドへの追加の結合を調製し得るか、または固体支持体に共役されてもよい。5 および3 末端OHをリン酸化するか、またはアミンもしくは1~20個の炭素原子の有機キャッピング基部分と置換することができる。他のヒドロキシルは、標準保護基に誘導体化されてもよい。ポリヌクレオチドは、一般に当該技術分野において既知のリボースまたはデオキシリボース糖の類似形態を含むこともでき、例えば、2'-O-メチル-2'-O-アリル、2'-フルオロ-もしくは2'-アジド-リボース、炭素環式糖類似体、アノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロース、もしくはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式類似体、および脱塩基ヌクレオシド類似体、例えば、メチルリボシドが挙げられる。1つ以上のホスホジエステル結合は、代替連結基に置き換えられてもよい。これらの代替連結基としては、限定されないが、リン酸塩がP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR<sub>2</sub>(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR、COまたはCH<sub>2</sub>(「ホルムアセタール」)に置き換えられる実施形態を含み、各RまたはR'は、独立してHであるか、または置換もしくは非置換アルキル(1-20C)(任意にエーテル(-O-)結合を含む)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはアラルジルである。ポリヌクレオチド内のすべての結合が同一である必要はない。前述の説明は、RNAおよびDNAを含む、本明細書において言及される全てのポリヌクレオチドに適用する。

#### 【0062】

本明細書において用いられるとき、「オリゴヌクレオチド」は、少なくとも約7ヌクレオチド長、約250ヌクレオチド長未満の短い一本鎖ポリヌクレオチドを指す。オリゴヌクレオチドは合成であってもよい。用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、相互排他的ではない。ポリヌクレオチドに関する上記の説明は、等しく完全にオリゴヌクレオチドに適用可能である。

#### 【0063】

用語「プライマー」は、核酸にハイブリダイズすることができ、一般に遊離3'-OH基を提供することにより相補的核酸の重合を可能にする、一本鎖ポリヌクレオチドを指す。

#### 【0064】

本明細書において用いられるとき、用語「遺伝子」は、DNA配列であって、そのテンプレートまたはメッセンジャーRNAを通じて、特定のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の特徴であるアミノ酸の配列をコードする、DNA配列を指す。用語「遺伝子」は、RNA産物をコードするDNA配列も指す。ゲノムDNAを参照して本明細書において用いられるとき、用語「遺伝子」は、介在する非コード領域ならびに調節領域を含み、5'および3'末端を含むことができる。

#### 【0065】

用語「遺伝的変異」または「ヌクレオチド変異」は、参照配列(例えば、一般に見出される、および/もしくは野生型配列、ならびに/または主要対立遺伝子の配列)に対する、ヌクレオチド配列内の変化(例えば、1つ以上のヌクレオチド、例えば、一塩基多型(SNP)の挿入、欠失、逆位、または置換)を指す。本用語は、別段の指示がない限り、ヌクレオチド配列の相補体の対応する変化も包含する。一実施形態では、遺伝的変異は、体細胞多型である。一実施形態では、遺伝的変異は、生殖細胞多型である。

#### 【0066】

「一塩基多型」、または「SNP」は、異なる対立遺伝子、または代替ヌクレオチドが集団内に存在する、DNA内の一塩基位置を指す。SNP位置は、通常、その対立遺伝子の高度に保存された配列(例えば、集団の1/100または1/1000メンバー未満で

10

20

30

40

50

異なる配列)により先行および後続される。個人は、各SNP位置における対立遺伝子に対してホモ接合性またはヘテロ接合性であり得る。

【0067】

用語「アミノ酸変異」は、参照配列に対するアミノ酸配列の変化(例えば、1つ以上のアミノ酸の挿入、置換、または欠失、例えば、内部欠失またはN末端もしくはC末端切断)を指す。

【0068】

用語「変異」は、ヌクレオチド変異またはアミノ酸変異のいずれかを指す。

【0069】

用語「SNPに対応するヌクレオチド位置における遺伝的変異」、「SNPに対応するヌクレオチド位置におけるヌクレオチド変異」、およびそれらの文法的変型は、ゲノム内の該SNPにより占拠される相対的な対応するDNA位置におけるポリヌクレオチド配列内のヌクレオチド変異を指す。本用語は、別段の指示がない限り、ヌクレオチド配列の相補体の対応する変化も包含する。

10

【0070】

本明細書において用いられるとき、用語「対立遺伝子」は、染色体内の所定の遺伝子座で発生する遺伝子または非遺伝子領域の対または一連の形態のうちの1つを指す。正常2倍体細胞内には、任意の1つの遺伝子(各親から1つ)の2つの対立遺伝子があり、相同染色体上の同一の相対位置(遺伝子座)を占拠する。集団内には、遺伝子の2つより多くの対立遺伝子が存在してもよい。SNPは、対立遺伝子、すなわちそのSNPを特徴付ける2つ(以上)のヌクレオチドも有する。

20

【0071】

本明細書において用いられるとき、用語「連鎖不均衡」または「LD」は、2つ以上の遺伝子座の対立遺伝子が、それらの個別の対立遺伝子頻度の積により予測される頻度で、集団からサンプリングされた個人において一緒に発生しなかった状況を指す。LDにあるマーカーは、独立したランダム分離に関するメンデルの第二の法則に従わない。LDは、いくつかの人口学的または集団アーチファクトのうちのいずれか、ならびにマーカー間の遺伝的連鎖の存在により引き起こされ得る。しかしながら、これらのアーチファクトがLDの起源として制御および排除されると、次にLDは、関与する遺伝子座が、異なるマーカー(ハプロタイプ)に対する対立遺伝子の特定の組み合わせと一緒に継承されるように、同一染色体上で互いの近くに位置するという事実から直接生じる。高LDにあるマーカーは、互いの近くに位置すると想定することができ、遺伝的形質を持つ高LDにあるマーカーまたはハプロタイプは、その形質に作用する遺伝子の近くに位置すると想定され得る。

30

【0072】

本明細書において用いられるとき、用語「遺伝子座」は、染色体またはDNA配列に沿った特定の位置を指す。文脈に応じて、遺伝子座は、遺伝子、マーカー、染色体バンド、または1つ以上のヌクレオチドの特定配列であり得る。

【0073】

用語「アレイ」または「マイクロアレイ」は、基質上のハイブリダイズ可能なアレイ要素の秩序配置、好ましくはポリヌクレオチドプローブ(例えば、オリゴヌクレオチド)を指す。基質は、ガラススライド等の固体基質、またはニトロセルロース膜等の半固体基質であり得る。

40

【0074】

用語「増幅」は、参照核酸配列またはその相補体の1つ以上の複製を生成する過程を指す。増幅は、線形または指数関数的であってよい(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR))。「複製」は、必ずしもテンプレート配列に対して完全な配列相補性または同一性を意味するとは限らない。例えば、複製は、デオキシイノシン等のヌクレオチド類似体、意図的な配列変異(テンプレートに対してハイブリダイズ可能であるが、完全に相補的ではない配列を含むプライマーを通じて導入される配列変異等)、および/または増幅中に

50



発生する配列エラーを含み得る。

【0075】

用語「対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチド変異（多くの場合、置換）を含む標的核酸の領域に対してハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを指す。「対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション」は、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドが、その標的核酸に対してハイブリダイズされるとき、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド内のヌクレオチドが、ヌクレオチド変異と特異的に塩基対合することを意味する。特定のヌクレオチド変異に関して対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションが可能な対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、その変異「に対して特異的」とであると言われる。

【0076】

用語「対立遺伝子特異的プライマー」は、プライマーである対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを指す。

【0077】

用語「プライマー伸長分析」は、ヌクレオチドが核酸に付加される分析を指し、直接または間接的に検出される、より長い核酸または「伸長産物」をもたらす。ヌクレオチドを付加して、核酸の5' または 3' 末端を伸長することができる。

【0078】

用語「対立遺伝子特異的ヌクレオチド取り込み分析」は、プライマーが、(a)ヌクレオチド変異の3' または5' である領域において標的核酸にハイブリダイズされ、(b)ポリメラーゼにより伸長され、それによりヌクレオチド変異に相補的なヌクレオチドを伸長産物に取り込む、プライマー伸長分析を指す。

【0079】

用語「対立遺伝子特異的プライマー伸長分析」は、対立遺伝子特異的プライマーが標的核酸にハイブリダイズされて伸長される、プライマー伸長分析を指す。

【0080】

用語「対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション分析」は、(a)対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドが標的核酸にハイブリダイズされ、(b)ハイブリダイゼーションが直接または間接的に検出される分析を指す。

【0081】

用語「5'ヌクレアーゼ分析」は、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの標的核酸に対するハイブリダイゼーションが、ハイブリダイズされたプローブの核酸分解切断を可能にし、検出可能なシグナルをもたらす分析を指す。

【0082】

用語「分子指標を用いる分析」は、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの標的核酸へのハイブリダイゼーションが、遊離オリゴヌクレオチドにより放出される検出可能なシグナルのレベルよりも高い検出可能なシグナルのレベルをもたらす分析を指す。

【0083】

用語「オリゴヌクレオチド結紮分析」は、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドが、標的核酸上で互いに隣接してハイブリダイズされ、(介在するヌクレオチドを通じて直接または間接的に)一緒に結紮され、その結紮産物が直接または間接的に検出される分析を指す。

【0084】

用語「標的配列」、「標的核酸」、または「標的核酸配列」は、一般に、ヌクレオチド変異の存在が疑われるか、または知られている目的のポリヌクレオチド配列を指し、増幅により生成されたそのような標的核酸の複製を含む。

【0085】

用語「検出」は、検出する任意の手段を含み、直接および間接的検出を含む。

【0086】

用語「IL6R」は、インターロイキン-6受容体を指すために用いられ、IL-6R1、IL-6RA、IL-6R、インターロイキン-6受容体サブユニット、および

10

20

30

40

50

CD126としても知られる。この用語は、「完全長」未処理のIL6R、ならびに細胞内の処理から生じるIL6Rの任意の形態を包含する。この用語は、IL6Rの天然に存在する変異型、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型も包含する。例示のヒトIL6Rのアミノ酸配列は、配列番号1に示される。

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPG  
 DSVTLTCTPGVEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRR  
 LLLRSVQLHDSGNYSCYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPQLS  
 CFRKSPLSNVVCEWGP RSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAED  
 FQEP CQYSQESQKFS CQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGS  
 KFSKTQTFQGC GILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQD  
 PHSWNS SFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIH  
 DAWSGLRHV VQLRAQEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRS  
 PPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSS  
 SVPLPTFLVAGGSLAFGTL L CIAIVLRFKKTWKLRALKEG  
 KTSMHPPYS LGQLVPERPRPTPVLVPLISP PVSPSSSLGSD  
 NTS SHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR (配列番号1) (Genbank  
 受託番号NP\_\_000566)。

10

【0087】

用語「NTF4」は、ニュートロフィン4 (neutrophin 4) を指すために用いられ、これは、ニュートロフィン5 (neutrophin 5)、  
 神経栄養因子4、神経栄養因子5、NT4、NT5、NT 4、NT 5、NTF5、  
 GLC10、およびNT-4/5としても知られる。この用語は、「完全長」未処理のNTF4、  
 ならびに細胞内の処理から生じるNTF4の任意の形態を包含する。この用語は、  
 NTF4の天然に存在する変異型、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型  
 も包含する。例示のヒトNTF4のアミノ酸配列は、配列番号2に示される。

20

MLPLPSCSLPI LLLFLLPSVPIESQPPPSTLPPFLAPEWD  
 LLSPRVVLSRGAPAGPPLLFLLEAGAFRESAGAPANRSRR  
 GVSETAPASRRGELAVCD AVSGWVTD RRTAVDLRGREVEV  
 LGEVPAAGGSP LRQYFFETRCKADNAEEGGPGAGGGGCRG  
 VDRRHWS ECKAKQSYVRAL TADAQGRV GWRWIRIDTACV  
 C TLLSRTGRA (配列番号2) (Genbank 受託番号NP\_\_006170)。

30

【0088】

用語「UNC5C」は、ネトリン受容体UNC5Cを指すために用いられ、これは、U  
 NC-5相同体3、UNC-5相同体C、およびUNC5H3としても知られる。この用  
 語は、「完全長」未処理のUNC5C、ならびに細胞内の処理から生じるUNC5Cの任  
 意の形態を包含する。この用語は、UNC5Cの天然に存在する変異型、例えば、スプ  
 ライス変異型または対立遺伝子変異型も包含する。例示のヒトUNC5Cのアミノ酸配列は  
 、配列番号3に示される。

MRKGLRATAARCGLGLGYLLQMLVLPALALLSASGTGSA  
 QDDDFHELPETFPSDPPEPLPHFLIEPEEAYIVKNKPVN  
 LYCKASPATQIYFKCNSEWVHQKDHIVDERVDETSGLIVR  
 EVSIEISRQQVEELFGPEDYWCQCVAWS SAGTTKSRKAYV  
 RIAYLRKKTFEQEPLGKEVSLEQEVLLQCRPPEGIPVAEVE  
 WLKNEDIIDPVEDRNFYITIDHNLIIKQARLSDTANYTCV  
 AKNIVAKRKSTTATVIVYVNGGWSTWTEWSVCNSRCGRGY  
 QKRTRTCTNPAPLNGGAFCEGQSVQKIACTTLC PVDGRWT  
 PWSKWSTCGTECTHWR RRECTAPAPKNGGKDCDGLVLQSK  
 NCTDGLCMQTAPDSDDVALYVGIVIAVIVCLAISVVVALF  
 VYRKNHRDFESDIIDS S ALNGGFQPVNIKAARQDLLAVPP  
 DLTSA AAMYRGPVYALHDVSDKI PMTNSPI LDPLPNLKIK

40

50

V Y N T S G A V T P Q D D L S E F T S K L S P Q M T Q S L L E N E A L S L K N Q  
 S L A R Q T D P S C T A F G S F N S L G G H L I V P N S G V S L L I P A G A I P  
 Q G R V Y E M Y V T V H R K E T M R P P M D D S Q T L L T P V V S C G P P G A L  
 L T R P V V L T M H H C A D P N T E D W K I L L K N Q A A Q G Q W E D V V V V G  
 E E N F T T P C Y I Q L D A E A C H I L T E N L S T Y A L V G H S T T K A A A K  
 R L K L A I F G P L C C S S L E Y S I R V Y C L D D T Q D A L K E I L H L E R Q  
 M G G Q L L E E P K A L H F K G S T H N L R L S I H D I A H S L W K S K L L A K  
 Y Q E I P F Y H V W S G S Q R N L H C T F T L E R F S L N T V E L V C K L C V R  
 Q V E G E G Q I F Q L N C T V S E E P T G I D L P L L D P A N T I T T V T G P S  
 A F S I P L P I R Q K L C S S L D A P Q T R G H D W R M L A H K L N L D R Y L N  
 Y F A T K S S P T G V I L D L W E A Q N F P D G N L S M L A A V L E E M G R H E  
 T V V S L A A E G Q Y ( 配列番号 3 ) ( G e n b a n k 受託番号 N P \_ 0 0 3 7 1 9 )

10

【 0 0 8 9 】

本明細書において用いられるとき、用語「アルツハイマー病」( A D ) は、早発型 A D および遅発型 A D の両方、ならびに家族性および散発性形態の A D の両方を指す。

【 0 0 9 0 】

本明細書において用いられるとき、アルツハイマー病を発症する「危険性のある」対象は、検出可能な疾患または疾患の症状を有していてもいなくてもよく、本明細書に記載される治療方法の前に、検出可能な疾患または疾患の症状を呈していてもいなくてもよい。「危険性のある」とは、対象が、本明細書に記載され、当該技術分野において既知のように、アルツハイマー病の発症と相関する測定可能なパラメータである、1つ以上の危険因子を有することを意味する。これらの危険因子のうちの1つ以上を有する対象は、これらの危険因子(複数可)のうちの1つ以上を有しない対象よりもアルツハイマー病を発症する可能性が高い。

20

【 0 0 9 1 】

用語「診断」は、本明細書において、分子または病理状態、疾患、もしくは状態、例えば A D の識別または分類を指すために用いられる。「診断」は、例えば、分子構造による A D の特定の亜型(例えば、特定の遺伝子または核酸領域内の遺伝的変異(複数可)により特徴付けられる患者の亜集団)の分類も指し得る。

30

【 0 0 9 2 】

用語「診断を補助する」は、本明細書において、A D の特定の種類の症状または状態の存在または性質に関する臨床決定を行うことを助ける方法を指すために用いられる。例えば、A D の診断を補助する方法は、個人からの生体試料中の A D を示す1つ以上の遺伝子マーカーの存在もしくは非存在、または A D を有する危険性の増加を測定することを含み得る。

【 0 0 9 3 】

用語「予知」は、本明細書において、例えば、記憶喪失および認知症を含む、A D の症状を発症する可能性の予測を指すために用いられる。用語「予測」は、患者が薬物または一式の薬物に対して良好または不良に反応する可能性を指すために用いられる。一実施形態では、予測は、そのような反応の程度に関する。一実施形態では、予測は、患者が、例えば、特定の治療薬による治療等の治療後、および疾患の再発なしに一定期間生存もしくは改善するか否か、および/またはその可能性に関する。本発明の予測方法を用いて、任意の特定患者に対して最適な治療法を選択することにより、臨床的に治療決定を行うことができる。本発明の予測方法は、患者が、例えば、所定の治療薬もしくは組み合わせの投与、外科的介入、ステロイド治療等を含む所定の治療計画等の治療計画に対して良好に反応し得るか、または治療計画に続く患者の長期生存が起り得るか否かを予測することにおいて有益なツールである。

40

【 0 0 9 4 】

本明細書において用いられるとき、「治療」は、治療される個人または細胞の自然経過

50

を変更する試みにおける臨床的介入を指し、臨床病理学の経過前または経過中に行うことができる。治療の望ましい効果は、疾患または状態もしくはその症状の発生もしくは再発を予防することと、疾患の状態または症状を軽減することと、疾患の任意の直接または間接的病理的帰結を低下させることと、疾患の進行速度を減少させることと、疾患状態を軽減または緩和することと、寛解または予後改善を達成することと、を含む。いくつかの実施形態では、本発明の方法および組成物は、疾患または障害の発症を遅らせる試みにおいて有用である。

【0095】

「AD治療薬」、「ADを治療するために有効な治療薬」、およびその文法的変型は、本明細書において用いられるとき、有効な量で提供されるとADを有する対象における治療利益を提供することが知られているか、臨床的に示されるか、または医師により予想される薬剤を指す。一実施形態では、この表現は、有効な量で提供されるとき、ADを有する対象において治療効果を提供することが予想され、臨床的に許容されている薬剤として、臨床製造者により市販されているか、またはそうでなければ有資格の医師により用いられる、任意の薬剤を含む。様々な非限定的実施形態では、AD治療薬は、コリンエステラーゼ阻害薬、メマンチン、抗興奮薬、抗うつ薬、抗不安薬、またはアミロイド前駆体タンパク質、アミロイド、アミロイドブランク、もしくは限定されないが、 $\alpha$ -セクレターゼ、 $\beta$ -セクレターゼ、および $\gamma$ -セクレターゼを含む、アミロイド前駆体タンパク質を切断する酵素のいずれかを標的とする化合物を含む。

【0096】

用語「薬学的製剤」は、有効であるようにその中に含まれる活性成分の生物活性を許すような形態であり、製剤が投与される対象に対して許容不可能に毒性である追加の成分を含まない調製物を指す。

【0097】

「薬学的に許容される担体」は、対象に対して非毒性である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または保存剤が挙げられる。

【0098】

「治療効果」は、病気を患っていない個人における平均的または正常な状態よりも良好である状態の生成を指す（すなわち、影響を受けていないか、または無症候性の対象における正常または平均状態と比較して、CNSの機能に少なくとも部分的に起因する対象における、認知、記憶、気分、または他の特徴の改善等の超正常効果）。

【0099】

「有効な量」は、所望の治療結果または予防結果を達成するために必要な用量および期間に有効な量を指す。治療薬の「治療上有効な量」は、個人の疾患状態、年齢、性別、および体重等の要因、ならびに個人における所望の反応を引き出す抗体の能力により変動し得る。治療上有効な量は、治療上有益な効果が、治療薬の任意の毒性または有害効果を上回るものでもある。「予防上有効な量」は、所望の予防結果を達成するために必要な用量および期間に有効な量を指す。典型的であって必ずしもそうではないが、疾患の早期段階前または早期段階で予防用量が対象において用いられるため、予防上有効な量は、治療上有効な量よりも少ない。

【0100】

「個人」、「対象」、または「患者」は、脊椎動物である。ある特定の実施形態では、脊椎動物は、哺乳類である。哺乳類としては、限定されないが、霊長類（ヒトおよび非ヒト霊長類を含む）ならびに齧歯類（例えば、マウスおよびラット）が挙げられる。ある特定の実施形態では、哺乳類はヒトである。

【0101】

「患者亜集団」およびその文法的変型は、本明細書において用いられるとき、患者のサブセットを、それが属するより広範な疾患カテゴリー内の他のものから区別する1つ以上の特有の測定可能および/または識別可能な特徴を有するとして特徴付けられる患者のサ

10

20

30

40

50

ブセットを指す。このような特徴は、疾患のサブカテゴリー、性別、ライフスタイル、既往歴、関与する器官/組織、治療歴等を含む。一実施形態では、患者亜集団は、特定のヌクレオチド位置および/または領域(例えば、SNP)内の遺伝的変異を含む、遺伝子サインにより特徴付けられる。

【0102】

「対照対象」は、ADを有するとして診断されていない、ADと関連付けられた任意の兆候または症状を患っていない健全な対象を指す。

【0103】

用語「試料」は、本明細書において用いられるとき、例えば、物理的、生化学的、化学的、および/または生理学的特徴に基づいて特徴付けられる、および/または識別される細胞および/または他の分子の実体を含む、目的の対象から得られる、もしくはそれに由来する組成物を指す。例えば、表現「疾患試料」およびその変型は、特徴付けられる細胞および/もしくは分子の実体を含むことが予想されるか、または知られている目的の対象から得られる任意の試料を指す。

10

【0104】

「組織または細胞試料」は、対象または患者の組織から得られる同様の細胞の集合を意味する。組織または細胞試料の供給源は、新鮮な冷凍および/もしくは保存された器官または組織試料もしくは検体もしくは吸引物からの固体組織;血液もしくは任意の血液組成物;脳脊髄液、羊水、腹腔液、または間質液等の体液;対象の妊娠または発達における任意の時点からの細胞であってよい。組織試料は、一次または培養された細胞または細胞株であってもよい。任意に、組織または細胞試料は、疾患組織/器官から得られる。組織試料は、保存剤、抗凝固剤、緩衝剤、固定剤、栄養素、抗生物質等の自然界で組織と自然に混合されない化合物を含んでよい。「参照試料」、「参照細胞」、「参照組織」、「対照試料」、「対照細胞」、または「対照組織」は、本明細書において用いられるとき、本発明の方法または組成物が識別に用いられる疾患または状態に罹患していないことが知られる、または罹患していないと考えられる供給源から得られる試料、細胞、または組織を指す。一実施形態では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対照組織は、疾患または状態が、本発明の組成物または方法を用いて識別される同一対象または患者の身体の健全な部分から得られる。一実施形態では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対照組織は、疾患または状態が、本発明の組成物または方法を用いて識別される対象または患者ではない個人の身体の健全な部分から得られる。

20

30

【0105】

本明細書における目的では、組織試料の「切片」は、組織試料の単一部分または単一片、例えば、組織試料から切断された組織または細胞の薄片を意味する。組織試料の複数の切片は、本発明に従って採取され、分析に供され得ることが理解されるが、但し、本発明は、組織試料の同一切片を、形態学的レベルおよび分子レベルの両方で分析するか、またはタンパク質および核酸の両方に関して分析する方法を含むことが理解される。

【0106】

「関連する」または「関連」は、任意の方法で、第1の分析またはプロトコルの性能および/もしくは結果を、第2の分析またはプロトコルの性能および/もしくは結果と比較することを意味する。例えば、第1の分析もしくはプロトコルの結果を第2のプロトコルを実行する際に用いてよく、および/または第1の分析もしくはプロトコルの結果を用いて、第2の分析もしくはプロトコルを行うべきか否かを決定してもよい。遺伝子発現分析またはプロトコルの実施形態に関して、この遺伝子発現分析またはプロトコルの結果を用いて、特定の治療計画を行うべきか否かを決定してもよい。

40

【0107】

用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、最も広い意味で同義的に用いられ、モノクローナル抗体(例えば、完全長または正常なモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多特異的抗体(例えば、所望の生物活性を呈する限り二特異的抗体)を含み、(本明細書においてより詳細に説明されるように)ある特定の抗体断片を含

50

んでもよい。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化、および/または親和性成熟であり得る。「抗体断片」は、正常な抗体の一部を含み、好ましくはその抗原結合領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、およびFv断片；二重特異性抗体；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子；および抗体断片から形成された多特異的抗体が挙げられる。

【0108】

「小分子」または「有機小分子」は、本明細書において、約500ダルトン以下の分子量を有する有機分子として定義される。

【0109】

「標識」という語は、本明細書において用いられるとき、検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体が検出可能であり得るか（例えば、放射性同位標識または蛍光標識）、または酵素標識の場合、検出可能な産物をもたらす基質化合物または組成物の化学的変質を触媒し得る。検出可能な標識として機能し得る放射性核種としては、例えば、I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、およびPd-109が挙げられる。

10

【0110】

本明細書における「約」の値またはパラメータに対する言及は、その値またはパラメータ自体に向けられる実施形態を含む（および説明する）。例えば、「約X」について言及する説明は、「X」の説明を含む。

【0111】

用語「添付文書」は、治療薬の市販パッケージに習慣的に含まれる、適応、用途、用量、投与、複合療法、禁忌、および/またはそのような治療薬の使用に関する警告についての情報を含む指示書を指すために用いられる。

20

【0112】

本発明の組成物および方法  
遺伝的変異

一態様では、本発明は、対象からの試料中のアルツハイマー病（AD）と関連付けられる遺伝的変異の存在または非存在を検出する方法、ならびに対象からの試料中のこれらの遺伝的変異の1つ以上の存在または非存在を検出することにより、ADを診断および予知する方法を提供し、遺伝的変異の存在が、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。ADの危険性と関連付けられた遺伝的変異は、ゲノム全領域関連研究、修飾因子スクリーニング、および家族ベースのスクリーニングを含む戦略を用いて識別された。

30

【0113】

本発明の方法において使用するための遺伝的変異は、インターロイキン-6受容体（IL6R）、神経栄養因子4（NTF4）およびUNC5C、またはこれらのタンパク質をコードする遺伝子、ならびに表3に列挙される遺伝子のうちのいずれか、もしくはそれらがコードするタンパク質内の遺伝的変異を含む。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、遺伝子（またはその調節領域）をコードするゲノムDNA内にあり、この遺伝子は、インターロイキン-6受容体（IL6R）、神経栄養因子4（NTF4）、およびUNC5C、ならびに表3に列挙される遺伝子のうちのいずれかをコードする遺伝子から選択される。様々な実施形態では、遺伝的変異は、IL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される1つ以上の遺伝子、ならびに表3に列挙される遺伝子のいずれかにおけるSNP、対立遺伝子、ハプロタイプ、挿入、または欠失である。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列（配列番号1）内でアミノ酸置換D358AをもたらすSNPである。一実施形態では、遺伝的変異は、rs2228145における「C」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列（配列番号2）内でアミノ酸置換R206WをもたらすSNPである。一実施形態では、遺伝的変異は、rs121918427における「T」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列（配列番号3）内でアミノ酸置換T835Mを

40

50

もたらずSNPである。実施形態では、遺伝的変異は、表3に列挙されるものから選択される遺伝子内のSNPである。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、rs12733578、rs4658945、rs1478161、rs1024591、rs7799010、rs10969475、およびrs12961250から選択されるSNPである。様々な実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異は、IL6R、NTF4、またはUNC5C内のアミノ酸置換、挿入、または欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、アミノ酸置換である。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358Aである。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内のアミノ酸置換R206Wである。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のアミノ酸置換T835Mである。

10

#### 【0114】

##### 遺伝的変異の検出

本明細書に記載される検出方法のいずれかにおいて用いられる核酸は、ゲノムDNA、ゲノムDNAから転写されるRNA、またはRNAから生成されるcDNAであってよい。核酸は、脊椎動物、例えば、哺乳類に由来し得る。核酸は、その供給源から直接得られる場合、またはその供給源において見出される核酸の複製である場合、特定の供給源「に由来する」と言われる。

#### 【0115】

核酸は、核酸の複製、例えば、増幅から生じる核酸の複製を含む。増幅は、場合によっては、例えば、変異を検出するための所望の量の材料を得るために望ましいことがある。次に、単位複製配列を、以下に記載されるもの等の変異検出法に供して、変異が単位複製配列内に存在するか否かを決定し得る。

20

#### 【0116】

遺伝的変異は、当業者に知られているある特定の方法により検出され得る。このような方法としては、限定されないが、DNA配列決定；対立遺伝子特異的ヌクレオチドの取り込み分析および対立遺伝子特異的プライマー伸長分析(例えば、対立遺伝子特異的PCR、対立遺伝子特異的結紮連鎖反応(LCR)、およびギャップLCR)を含むプライマー伸長分析；対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション分析(例えば、オリゴヌクレオチド結紮分析)；切断剤からの保護を用いて核酸二本鎖内のミスマッチ塩基を検出する切断保護分析；MutSタンパク質結合の分析；変異型および野生型核酸分子の移動性を比較する電気泳動分析；変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE、例えば、Myers et al. (1985) Nature 313: 495)；ミスマッチ塩基対におけるRNase切断の分析；ヘテロ二本鎖DNAの化学的または酵素的切断の分析；質量分析(例えば、MALDI-TOF)；遺伝的ビット分析(GBA)；5'ヌクレアーゼ分析(例えば、TaqMan(商標))；および分子指標を用いる分析が挙げられる。これらの方法のうちの一部は、以下でさらに詳述される。

30

#### 【0117】

標的核酸内の変異の検出は、当該技術分野においてよく知られている技術を用いて、標的核酸の分子クローン化および配列決定により達成され得る。あるいは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の増幅技術を用いて、腫瘍組織からのゲノムDNA調製物から標的核酸配列を直接増幅させることができる。次に、増幅された配列の核酸配列を決定することができ、そこから変異を識別することができる。増幅技術は、当該技術分野においてよく知られており、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応は、Saiki et al., Science 239: 487, 1988、米国特許第4,683,203号および第4,683,195号に記載されている。

40

#### 【0118】

当該技術分野において既知の結紮連鎖反応を用いて、標的核酸配列を増幅させることができる。例えば、Wu et al., Genomics 4: 560-569 (1989)を参照されたい。さらに、対立遺伝子特異的PCRとして既知の技術を用いて、変異(

50

例えば、置換)を検出することもできる。例えば、Ruano and Kidd (1989) *Nucleic Acids Research* 17: 8392; McClay et al. (2002) *Analytical Biochem.* 301: 200-206を参照されたい。この技術のある特定の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが用いられ、このプライマーの3'末端ヌクレオチドは、標的核酸内の特定の変異に対して相補的(すなわち、それと特異的に塩基対合することができる)。特定の変異が存在しない場合、増幅産物は観測されない。増幅抵抗突然変異システム(ARMS)を用いて、変異(例えば、置換)を検出することもできる。ARMSは、例えば、欧州特許出願公開第0332435号、およびNewton et al., *Nucleic Acids Research*, 17: 7, 1989において説明されている。

10

## 【0119】

変異(例えば、置換)を検出するために有用な他の方法としては、限定されないが、(1)対立遺伝子特異的ヌクレオチド取込分析、例えば、一塩基伸長分析(例えば、Chen et al. (2000) *Genome Res.* 10: 549-557、Fan et al. (2000) *Genome Res.* 10: 853-860、Pastinen et al. (1997) *Genome Res.* 7: 606-614、およびYe et al. (2001) *Hum. Mut.* 17: 305-316を参照); (2)対立遺伝子特異的プライマー伸長分析(例えば、Ye et al. (2001) *Hum. Mut.* 17: 305-316、およびShen et al. *Genetic Engineering New*, vol. 23, Mar. 15, 2003を参照)、対立遺伝子特異的PCRを含む; (3)5'ヌクレアーゼ分析(例えば、De La Vega et al. (2002) *BioTechniques* 32: S48-S54 (TaqMan RTM.分析を説明する)、Ranade et al. (2001) *Genome Res.* 11: 1262-1268、およびShi (2001) *Clin. Chem.* 47: 164-172を参照); (4)分子指標を用いる分析(例えば、Tyagi et al. (1998) *Nature Biotech.* 16: 49-53、およびMhlanga et al. (2001) *Methods* 25: 463-71を参照); および(5)オリゴヌクレオチド結紮分析(例えば、Grossman et al. (1994) *Nuc. Acids Res.* 22: 4527-4534、特許出願公開第US2003/0119004A1号、PCT国際公開第01/92579A2号、および米国特許第6,027,889号を参照)が挙げられる。

20

30

## 【0120】

変異は、ミスマッチ検出法により検出されてもよい。ミスマッチは、100%相補性ではないハイブリダイズされた核酸二本鎖である。全相補性の欠如は、欠失、挿入、逆位、または置換に起因し得る。ミスマッチ検出法の一例は、例えば、Faham et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 14717-14722 (2005)、およびFaham et al., *Hum. Mol. Genet. Genet.* 10: 1657-1664 (2001)において説明されるミスマッチ修復検出(MRD)分析である。ミスマッチ切断技術の別の例は、RNase保護法であり、Winter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7575, 1985、およびMyers et al., *Science* 230: 1242, 1985において詳細に説明される。例えば、本発明の方法は、ヒト野生型標的核酸に相補的な標識リボプローブの使用を伴ってよい。組織試料に由来するリボプローブおよび標的核酸は、一緒にアニール(ハイブリダイズ)され、二本鎖RNA構造内でいくつかのミスマッチを検出することができる、酵素RNase Aで後次に分解される。ミスマッチがRNase Aにより検出される場合、それはミスマッチの部位において切断する。したがって、アニールされたRNA調製物が電気泳動ゲルマトリックス上で分離されるとき、ミスマッチが検出され、RNase Aにより切断される場合、リボプローブおよびmRNAまたはDNAの完全長二本鎖RNAより小さいRNA産物が見られる。リボプローブは、完全長の標的核酸である必要はなく、標的核酸の一部であり得るが、但し、変異を有す

40

50



ることが疑われる位置を包含する。

【0121】

同様の方法で、DNAプローブを用いて、例えば、酵素または化学的切断を通じて mismatchesを検出することができる。例えば、Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:4397, 1988、および Shenk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:989, 1975を参照されたい。あるいは、 mismatchesは、マッチ二本鎖に対して mismatches二本鎖の電気泳動移動度のシフトにより検出され得る。例えば、Carriello, Human Genetics, 42:726, 1988を参照されたい。リボプローブまたはDNAプローブのいずれかを用いて、変異を含むことが疑われる標的核酸は、ハイブリダイゼーション前に増幅されてよい。標的核酸の変化は、特にその変化が欠失および挿入等のグロス転位である場合、サザンハイブリダイゼーションを用いて検出することもできる。

10

【0122】

標的核酸または周囲のマーカー遺伝子の制限断片長多型(RFLP)プローブを用いて、例えば、挿入または欠失等の変異を検出することができる。挿入および欠失は、標的核酸のクローニング、配列決定、および増幅により検出することもできる。一本鎖高次構造多型(SSCP)分析を用いて、対立遺伝子の塩基変化変異型を検出することもできる。例えば、Orita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766-2770, 1989、および Genomics, 5:874-879, 1989を参照されたい。SSCPは、一本鎖PCR産物の電気泳動移動度の変化による塩基差を識別する。一本鎖PCR産物は、二本鎖PCR産物を加熱するか、または他の方法で変性させることにより生成することができる。一本鎖核酸は、折り直すか、または塩基配列に部分的に依存する二次構造を形成してもよい。一本鎖増幅産物の異なる電気泳動移動度は、SNP位置における塩基配列差に関係する。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)は、多型DNAに固有の異なる配列依存性の安定性および溶解特性、および変性剤濃度勾配ゲル中の電気泳動移動度パターンの対応する差に基づいて、SNP対立遺伝子を分化する。

20

【0123】

遺伝的変異は、マイクロアレイの使用により検出されてもよい。マイクロアレイは、典型的に、配列された一連の数千個の核酸プローブを用いて、例えば、cDNAまたはcRNA試料と高逼迫条件下でハイブリダイズする多重技術である。プローブ標的ハイブリダイゼーションは、典型的に、蛍光色素分子標識、銀標識、または化学発光標識された標的の検出により検出および定量され、標的中の核酸配列の相対存在度を決定する。典型的なマイクロアレイでは、プローブは、化学的マトリックスへの共有結合により(エポキシシラン、アミノシラン、リシン、ポリアクリルアミド、またはその他を介して)固体表面に付着する。個体表面は、例えば、ガラス、シリコンチップ、または微小ビーズである。様々なマイクロアレイは、市販されており、例えば、Affymetrix, Inc. および Illumina, Inc. により製造されるものを含む。

30

【0124】

SNP遺伝子型決定の別の方法は、質量分析に基づく。質量分析は、DNAの4つのヌクレオチドのそれぞれの固有の質量を利用する。SNPは、代替SNP対立遺伝子を有する核酸の質量の差を測定することにより、質量分析によって明確に遺伝子型決定することができる。MALDI-TOF(マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型)質量分析技術は、SNP等の分子質量の極めて正確な決定に有用である。SNP分析に対する多数の手法は、質量分析に基づいて開発された。SNP遺伝子型決定の例示的な質量分析に基づく方法としては、プライマー伸長分析が挙げられ、伝統的なゲルに基づく形式およびマイクロアレイ等の他の手法との組み合わせで用いることもできる。

40

【0125】

配列特異的リボザイム(米国特許第5,498,531号)を用いて、リボザイム切断部位の発達または喪失に基づいてSNPをスコアすることもできる。完全マッチ配列は、

50

ヌクレアーゼ切断分解分析または溶解温度の差によりミスマッチ配列から区別することができる。SNPが制限酵素切断部位に影響する場合、SNPは、制限酵素分解パターンの変化により識別することができ、核酸断片長の対応する変化は、ゲル電気泳動により決定される。

#### 【0126】

本発明の他の実施形態では、タンパク質に基づく検出技術を用いて、本明細書に記載される遺伝的変異を有する遺伝子よりコードされる変異型タンパク質を検出する。タンパク質の変異型形態の存在の決定は、当該技術分野において既知の任意の適した技術、例えば、電気泳動（例えば、変性または非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動、2次元ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、および等電点分画電気泳動）、クロマトグラフィー（例えば、サイズクロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、および陽イオン交換HPLC）、および質量分析（例えば、MALDI-TOF質量分析、エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析、およびタンデム質量分析）を用いて行うことができる。例えば、Ahrer and Jungbauer (2006) J. Chromatog. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 841:110-122、およびWada (2002) J. Chromatog. B. 781:291-301を参照されたい。適した技術は、検出される変異の性質に部分的に基づいて選択され得る。例えば、置換されたアミノ酸が、元のアミノ酸とは異なる電荷を有するアミノ酸置換をもたらす変異は、等電点電気泳動法により検出することができる。高電圧でのpH勾配を有するゲルを通じたポリペプチドの等電点電気泳動法は、タンパク質をそれらのpIにより分離する。pH勾配ゲルを、野生型タンパク質を含む、同時に流れるゲルと比較することができる。変異が、新たなタンパク分解切断部位の生成、または既存のタンパク分解切断部位の排除をもたらす場合、試料は、タンパク分解に続いて、適切な電気泳動、クロマトグラフィー、または質量分析法を用いてペプチドマッピングに供される。変異の存在は、Edman分解等のタンパク質配列決定法またはある特定の形態の質量分析を用いて検出されてもよい。

#### 【0127】

これらの技術の組み合わせを用いる当該技術分野において既知の方法が用いられてもよい。例えば、HPLC顕微鏡タンデム質量分析法において、タンパク分解をタンパク質に対して行い、得られるペプチド混合物を、逆相クロマトグラフィー分離により分離する。次にタンデム質量分析を行い、そこから収集されたデータを分析する。(Gatlin, et al. (2000) Anal. Chem., 72:757-763)。別の実施例では、非分解ゲル電気泳動を、MALDI質量分析と組み合わせる(Mathew et al. (2011) Anal. Biochem. 416:135-137)。

#### 【0128】

いくつかの実施形態では、タンパク質は、タンパク質を特異的に結合する抗体またはペプチド等の試薬を用いて試料から単離され得、次に、上で開示される技術のいずれかを用いて、遺伝的変異の存在または非存在を決定するためにさらに分析され得る。

#### 【0129】

あるいは、試料中の変異型タンパク質の存在は、本発明による遺伝的変異を有するタンパク質に特異的な抗体、つまり、変異を有するタンパク質に特異的に結合するが、変異を欠くタンパク質の形態には特異的に結合しない抗体に基づいて、免疫親和性分析により検出され得る。このような抗体は、当該技術分野において既知の任意の適した技術により生成することができる。抗体を用いて、溶液試料から特定のタンパク質を免疫沈降させることができる。例えば、ポリアクリルアミドゲルにより分離されたタンパク質を免疫プロットすることができる。免疫細胞化学的方法を、組織または細胞中の特定のタンパク質変異型を検出することにおいて用いることもできる。例えば、酵素免疫測定吸着法(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)、免疫放射定量測定法(IRMA)、および免疫酵素分析(IEMA)を含む、他のよく知られた抗体に基づく技術を用いることもでき、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いるサンドウィッチ分析を含む。例えば、米国特許第4,3

10

20

30

40

50

76, 110号および第4, 486, 530号を参照されたい。

【0130】

追加の遺伝子マーカーの識別

開示される遺伝子マーカーは、ADの発症と関連付けられる追加の遺伝子マーカーを識別するために有用である。例えば、本明細書において開示されるSNPを用いて、連鎖不均衡にある追加のSNPを識別することができる。実際に、ADと関連付けられる第1のSNPと連鎖不均衡にある任意のSNPは、ADと関連付けられる。所与のSNPとADとの間の関連が証明されると、ADと関連付けられる追加のSNPの発見は、この特定の領域内のSNPの密度を増加させるために、大きな関心となり得る。

【0131】

追加のSNPを識別し、連鎖不均衡分析を行うための方法は、当該技術分野においてよく知られている。例えば、本明細書において開示されるSNPとの連鎖不均衡にある追加のSNPの識別は、(a)複数の個人からの第1のSNPを含むか、または取り囲むゲノム領域からの断片を増幅させるステップと、(b)該第1のSNPを内包するか、または取り囲むゲノム領域内の第2のSNPを識別するステップと、(c)該第1のSNPと第2のSNPとの間で連鎖不均衡分析を行うステップと、(d)該第1のマーカーと連鎖不均衡にあるとして該第2のSNPを選択するステップと、を含み得る。

【0132】

組み合わせで使用するための追加の診断法

開示される遺伝子マーカーの検出は、対象がADを有するとして、またはADを発症する危険性が高いとして識別するための1つ以上の追加の診断手法と併せて用いられてもよい。例えば、対象は、本明細書において開示される遺伝子マーカーに加えて、追加の遺伝子マーカーについてスクリーニングすることができる。対象からの脳脊髄液は、ADの特徴であるアミロイド または タンパク質のレベルの増加について分析され得る。対象は、記憶、集中力、および他の認知スキルを評価するために、ミニメンタルステート検査(MMSE)等の精神状態の検査にも供され得る。対象は、アルツハイマー病を示す脳構造またはサイズの変化を識別するために、CTスキャン、MRI、SPECTスキャン、またはPETスキャン等の撮像法にも供され得る。

【0133】

アルツハイマー病の診断、予知、および治療

本発明は、対象からの試料中の本明細書において開示されるADと関連付けられる1つ以上の遺伝的変異の存在を検出することにより、対象におけるADの診断および予知の方法を提供する。本発明の実施形態では、1つ以上の遺伝的変異は、インターロイキン-6受容体(IL6R)、神経栄養因子4(NTF4)、およびUNC5C、ならびに表3に列挙される遺伝子のうちのいずれかをコードする遺伝子から選択される遺伝子内にある。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、遺伝子(またはその調節領域)をコードするゲノムDNA内にあり、この遺伝子は、インターロイキン-6受容体(IL6R)、神経栄養因子4(NTF4)、およびUNC5C、ならびに表3に列挙される遺伝子のうちのいずれかをコードする遺伝子から選択される。様々な実施形態では、遺伝的変異は、インターロイキン-6受容体(IL6R)、神経栄養因子4(NTF4)、およびUNC5C、ならびに表3に列挙される遺伝子のうちのいずれかをコードする遺伝子から選択される1つ以上の遺伝子内のSNP、対立遺伝子、ハプロタイプ、挿入または欠失である。一実施形態では、遺伝的変異は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内でアミノ酸置換D358AをもたらすSNPである。一実施形態では、遺伝的変異は、rs2228145における「C」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内でアミノ酸置換R206WをもたらすSNPである。一実施形態では、遺伝的変異は、rs121918427における「T」対立遺伝子である。一実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内でアミノ酸置換T835MをもたらすSNPである。実施形態では、遺伝的変異は、表3に列挙されるものから選択される遺伝子内のSNPである。いくつかの実施形態では、遺伝的変異は、rs12

10

20

30

40

50

733578、rs4658945、rs1478161、rs1024591、rs7799010、rs10969475、およびrs12961250から選択されるSNPである。これらの遺伝的変異のうちの任意の1つ以上は、以下に記載される検出、診断、および予知の方法のうちのいずれかにおいて用いられ得る。

【0134】

一実施形態では、本発明は、対象におけるアルツハイマー病（AD）を示す遺伝的変異の存在または非存在を検出するための方法を提供し、この方法は、（a）対象からの試料を、IL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される遺伝子内の遺伝的変異の存在または非存在を検出することができる試薬と接触させることと、（b）遺伝的変異の存在または非存在を決定することと、を含み、遺伝的変異の存在が、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。

10

【0135】

この方法において用いるための試薬は、オリゴヌクレオチド、DNAプローブ、RNAプローブ、およびリボザイムから選択され得る。いくつかの実施形態では、試薬は標識される。標識としては、例えば、放射性同位元素標識、蛍光標識、生物発光標識、または酵素標識が挙げられ得る。検出可能な標識として機能し得る放射性核種としては、例えば、I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、およびPd-109が挙げられる。

【0136】

本発明はさらに、対象におけるアルツハイマー病（AD）を示す遺伝的変異を検出するための方法を提供し、この方法は、対象からの生体試料中のIL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される遺伝子内の遺伝的変異の存在もしくは非存在を決定することを含み、遺伝的変異の存在が、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。この方法の様々な実施形態では、1つ以上の遺伝的変異の存在の検出は、直接配列決定、対立遺伝子特異的プローブハイブリダイゼーション、対立遺伝子特異的プライマー伸長、対立遺伝子特異的増幅、対立遺伝子特異的ヌクレオチドの取り込み、5'ヌクレアーゼ分解、分子指標検定、オリゴヌクレオチド結紮検定、サイズ分析、および一本鎖高次構造多型からなる群から選択される過程により実行される。いくつかの実施形態では、1つ以上の遺伝的変異の存在を決定する前に、試料からの核酸が増幅される。

20

30

【0137】

本発明はさらに、対象におけるADを診断または予知するための方法を提供し、この方法は、（a）対象からの試料を、IL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される遺伝子内の遺伝的変異の存在または非存在を検出することができる試薬と接触させることと、（b）遺伝的変異の存在または非存在を決定することと、を含み、遺伝的変異の存在が、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。

【0138】

本発明はさらに、対象におけるADを診断または予知する方法を提供し、この方法は、対象からの生体試料中のIL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される遺伝子内の遺伝的変異の存在もしくは非存在を決定することを含み、遺伝的変異の存在は、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。

40

【0139】

本発明は、対象におけるADを診断または予知するための方法も提供し、この方法は、（a）対象からの試料を含む核酸を得ることと、（b）試料を分析して、IL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される遺伝子内の少なくとも1つの遺伝的変異の存在または非存在を検出することと、を含み、遺伝的変異の存在は、対象がADに罹患しているか、またはADを発症する危険性があることを示す。

【0140】

50

いくつかの実施形態において、診断または予知の方法は、対象をADに関する1つ以上の追加の診断試験に供すること、例えば、1つ以上の追加の遺伝子マーカーをスクリーニングすること、精神状態の検査を行うこと、または対象を撮像法に供することをさらに含む。いくつかの実施形態において、この方法は、試料を分析して、APOE修飾因子である少なくとも1つの追加の遺伝子マーカーの存在を検出することをさらに含み、少なくとも1つの追加の遺伝子マーカーは、IL6Rをコードする遺伝子、NTF4をコードする遺伝子、UNC5Cをコードする遺伝子、および表3に列挙される遺伝子から選択される遺伝子内にある。

#### 【0141】

上記方法のうちのいずれかは、方法の結果に基づいて、対象のADを治療することをさらに含み得ることがさらに企図される。いくつかの実施形態では、上記方法は、試料中で少なくとも1つのAPOE-4対立遺伝子の存在を検出することをさらに含む。一実施形態では、少なくとも1つの遺伝的変異の存在は、少なくとも1つのAPOE-4対立遺伝子の存在と一緒にすると、少なくとも1つのAPOE-4対立遺伝子を有し、少なくとも1つの遺伝子マーカーの存在を欠く対象と比較して、ADの若年齢診断の危険性の増加を示す。

#### 【0142】

ADの若年齢の診断の危険性が増加した対象を識別する方法も提供され、この方法は、(a)対象からの生体試料中のIL6R、NTF4、およびUNC5Cをコードする遺伝子から選択される遺伝子内の遺伝的変異の存在もしくは非存在を決定することと、(b)少なくとも1つのAPOE-4対立遺伝子の存在を決定することと、を含み、遺伝的変異および少なくとも1つのAPOE-4対立遺伝子の存在が、遺伝的変異および少なくとも1つのAPOE-4対立遺伝子の存在を欠く対象と比較して、対象のADの若年齢診断の危険性が増加したことを示す。

#### 【0143】

対象におけるADの亜表現型の予知を補助する方法も提供され、対象に由来する生体試料中で、IL6R、NTF4、またはUNC5Cをコードする遺伝子内の遺伝的変異体の存在を検出することを含む。一実施形態では、遺伝的変異型は、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358AをもたらすSNPであり、ADの亜表現型は、1人以上の対照対象と比較して、対象に由来する生体試料中の可溶性IL6Rのレベルの増加により少なくとも部分的に特徴付けられる。別の実施形態では、遺伝的変異は、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内のアミノ酸置換R206WをもたらすSNPであり、ADの亜表現型は、1人以上の対照対象と比較して、対象に由来する生体試料中のTrkBの活性の減少により少なくとも部分的に特徴付けられる。別の実施形態では、遺伝的変異は、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のアミノ酸置換T835MをもたらすSNPであり、ADの亜表現型は、1人以上の対照対象と比較して、対象に由来する生体試料中のUNC5Cのアポトーシス活性の増加により少なくとも部分的に特徴付けられる。

#### 【0144】

本発明はさらに、IL6Rを標的とするAD治療薬に対する対象の反応を予知する方法を提供し、この方法は、対象から得られた生体試料中で、IL6Rのアミノ酸配列(配列番号1)内のアミノ酸置換D358AをもたらすSNPを検出することを含み、SNPの存在が、IL6Rを標的とする治療薬に対する反応を示す。一実施形態では、治療薬は、IL6R拮抗薬または結合剤、例えば、抗IL6R抗体である。

#### 【0145】

本発明はさらに、TrkBを標的とするAD治療薬に対する対象の反応を予知する方法を提供し、この方法は、対象から得られた生体試料中で、NTF4のアミノ酸配列(配列番号2)内のアミノ酸置換R206WをもたらすSNPを検出することを含み、SNPの存在は、TrkBを標的とする治療薬に対する反応を示す。一実施形態では、治療薬は、TrkB作動薬、例えば、TrkB作動薬抗体である。

10

20

30

40

50

## 【0146】

本発明はさらに、UNC5Cを標的とするAD治療薬に対する対象の反応を予知する方法を提供し、この方法は、対象から得られた生体試料中で、UNC5Cのアミノ酸配列(配列番号3)内のアミノ酸置換T835MをもたらすSNPを検出することを含み、SNPの存在は、UNC5Cを標的とする治療薬に対する反応を示す。一実施形態では、治療薬は、UNC5C死ドメインを標的とする。

## 【0147】

上記の方法のうちのいずれかにおいて使用するための生体試料は、当業者に既知のある特定の方法を用いて得られてよい。生体試料は、脊椎動物、および特に哺乳類から得られてもよい。ある特定の実施形態では、生体試料は、脳脊髄液、神経細胞、または脳組織等の細胞または組織を含む。標的核酸(またはコードされたポリペプチド)内の変異は、組織試料から、または脳脊髄液、血液、血清、尿、痰、唾液、粘膜剥離物、涙腺分泌物、もしくは汗等の他の体液試料から検出され得る。このような体試料をスクリーニングすることにより、AD等の疾患について簡単な早期診断を行うことができる。さらに、治療の進行は、標的核酸(またはコードされたポリペプチド)内の変異について、このような体試料を試験することによりさらに容易に監視することができる。いくつかの実施形態では、生体試料は、ADを有することが疑われる個人から得られる。

10

## 【0148】

対象、または対象から得られる生体試料が、本明細書において開示される遺伝的変異を含むという決定に続いて、対象におけるADを治療するために、有効な量の適切なAD治療薬が対象に投与され得ることが企図される。

20

## 【0149】

上記の方法により、本明細書において開示されるIL6R、NTF4、またはUNC5Cをコードする遺伝子のうちの任意の1つ以上、または表3に列挙される遺伝子内に遺伝的変異を含む、核酸内の1つ以上の変異の存在を検出することにより、哺乳類におけるADの診断を補助するための方法も提供される。

## 【0150】

別の実施形態では、上記の方法により、対象が本明細書において開示されるIL6R、NTF4、もしくはUNC5Cをコードする遺伝子のうちの1つ以上、または表3に列挙される遺伝子内に変異を含むか否かを決定することにより、ADを持つ対象が、治療薬に反応するか否かを予知するための方法が提供される。

30

## 【0151】

対象において、本明細書において開示されるIL6R、NTF4、またはUNC5Cをコードする遺伝子のうちの任意の1つ以上、または表3に列挙される遺伝子内の遺伝的変異の存在または非存在を検出することにより、対象がADを発症する傾向を評価するための方法も提供される。

## 【0152】

本明細書において開示されるIL6R、NTF4、もしくはUNC5Cをコードする遺伝子のうちの任意の1つ以上、または表3に列挙される遺伝子内の遺伝的変異の存在を検出することを含む、哺乳類においてADを亜分類する方法も提供される。

40

## 【0153】

患者亜集団におけるADを治療するために有効な治療薬を識別する方法も提供され、本方法は、本明細書において開示されるIL6R、NTF4、もしくはUNC5Cをコードする遺伝子のうちの任意の1つ以上、または表3に列挙される遺伝子内のSNPに対応するヌクレオチド位置における遺伝的変異の存在と、薬剤の有効性とを相関させることを含む。

## 【0154】

追加の方法は、必要に応じて、適切な臨床介入ステップを決定するために有用な情報を提供する。したがって、本発明の方法の一実施形態では、この方法は、本明細書において開示されるADと関連付けられる遺伝子内の変異の存在または非存在の評価の結果に基づ

50

いて、臨床介入ステップをさらに含む。例えば、適切な介入は、予防的および治療ステップ、または本発明の方法により得られる遺伝子情報に基づく任意の当時最新の予防的もしくは治療ステップの調整（複数可）を伴い得る。

【0155】

当業者に明らかとなるように、本明細書に記載される任意の方法で、変異の存在の検出は、疾患の特徴（例えば、疾患の存在または亜型）を陽性に示すが、変異の非検出もまた、疾患の相互特性化を提供することにより有益となる。

【0156】

なおもさらなる方法としては、哺乳類におけるADを治療する方法を含み、哺乳類からの生体試料を得るステップと、その生体試料を本明細書において開示される変異の存在または非存在について検査するステップと、該組織または細胞試料中の変異の存在または非存在を決定したときに、有効な量の適切な治療薬を該哺乳類に投与するステップと、を含む。任意に、この方法は、有効な量の標的AD治療薬を該哺乳類に投与することを含む。

10

【0157】

本明細書において開示されるIL6R、NTF4、もしくはUNC5Cをコードする遺伝子の任意の1つ以上、または表3に列挙される遺伝子内のSNPに対応するヌクレオチド位置において遺伝的変異が存在することが知られている対象におけるADを治療する方法も提供される。

【0158】

ADを有する対象を治療する方法も提供され、この方法は、本明細書において開示されるIL6R、NTF4、もしくはUNC5Cをコードする遺伝子のうちの任意の1つ以上、または表3に列挙される遺伝子内のSNPに対応するヌクレオチド位置において遺伝的変異を有する対象の状態を治療するために有効であることが知られている治療薬を対象に投与することを含む。

20

【0159】

ADを有する対象を治療する方法も提供され、この方法は、それぞれが、本明細書において開示されるIL6R、NTF4、もしくはUNC5Cをコードする遺伝子のうちの任意の1つ以上、または表3に列挙される遺伝子内のSNPに対応するヌクレオチド位置において遺伝的変異を有する少なくとも5人のヒト対象に薬剤が投与される、少なくとも1つの臨床研究において、該状態を治療するために有効であることが以前に示された治療薬を対象に投与することを含む。一実施形態では、少なくとも5人の対象は、少なくとも5人の対象群について、全体で2つ以上の異なるSNPを有した。一実施形態では、少なくとも5人の対象は、少なくとも5人の対象群全体で同一のSNPを有した。

30

【0160】

特異的なAD患者亜集団である、AD対象を治療する方法も提供され、亜集団に対する治療薬として承認される有効な量の治療薬を対象に投与することを含み、亜集団は、本明細書において開示されるIL6R、NTF4、もしくはUNC5Cをコードする遺伝子のうちの任意の1つ以上、または表3に列挙される遺伝子内のSNPに対応するヌクレオチド位置における遺伝的変異との関連により少なくとも部分的に特徴付けられる。

【0161】

一実施形態では、亜集団はヨーロッパ系である。一実施形態では、本発明は、AD治療薬を製造することと、ADを有するか、または有すると考えられ、本明細書において開示されるIL6R、NTF4、もしくはUNC5Cをコードする遺伝子のうちの任意の1つ以上、または表3に列挙される遺伝子内のSNPに対応する位置において遺伝的変異を有する対象にその薬剤を投与するための指示とともに、薬剤を包装することと、を含む、方法を提供する。

40

【0162】

AD治療薬で治療するためのADを患う患者を選択するための方法も提供され、本明細書において開示されるIL6R、NTF4、もしくはUNC5Cをコードする遺伝子のうちの任意の1つ、または表3に列挙される遺伝子内のSNPに対応するヌクレオチド位置

50

における遺伝的変異の存在を検出することを含む。

【0163】

A Dの治療のための治療薬は、いくつかの実施形態では、製薬学的用途に適した組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、典型的に、ペプチドまたはポリペプチド、および許容される担体、例えば、薬学的に許容されるものを含む。「薬学的に許容される担体」としては、薬品投与に適合する任意および全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等が挙げられる (Gennaro, Remington: The Science and practice of pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2000))。このような担体または希釈剤の例としては、限定されないが、水、生理食塩水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられる。リポソームおよび不揮発性油等の非水性媒体が用いられてもよい。従来の媒体または薬剤が活性成分と適合しない場合を除いて、これらの組成物の使用が企図される。補足的活性成分を組成物に組み込むこともできる。

10

【0164】

本発明の治療薬（およびA Dの治療のための任意の追加の治療薬）は、非経口、肺内、髄腔内、および鼻腔内を含み、局所治療の必要に応じて、病巣内投与を含む任意の適した手段により投与することができる。非経口注入としては、例えば、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が挙げられる。投薬は、投与が短期であるか、または長期であるかに部分的に依存して、任意の適した経路、例えば、静脈内または皮下注入等によることができる。限定されないが、様々な時点での単回または複数回投与、ポース投与、およびパルス点滴を含む様々な投薬スケジュールが本明細書において企図される。

20

【0165】

本発明のある特定の実施形態は、血液 - 脳障壁を越えるA D治療薬を提供する。いくつかの当該技術分野において既知の手法は、限定されないが、身体的方法、脂質に基づく方法、ならびに受容体およびチャネルに基づく方法を含む、血液 - 脳障壁を越えて分子を輸送するために存在する。

【0166】

血液 - 脳障壁を越えてA D治療薬を輸送する身体的方法としては、限定されないが、血液 - 脳障壁を全体的に回避するか、または血液 - 脳障壁内に開口を形成することが挙げられる。回避法としては、限定されないが、脳への直接注入（例えば、Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398 - 406 (2002)を参照）、および脳内に送達デバイスを埋め込むこと（例えば、Gillet et al., Nature Med. 9: 589 - 595 (2003)、およびGliadel Wafer (商標) Guildford Pharmaceuticalを参照）が挙げられる。障壁内に開口を形成する方法としては、限定されないが、超音波（例えば、米国特許公開第2002/0038086号参照）、浸透圧（例えば、高張マンニトールの投与による (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood - Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989))による）、例えば、ブラジキニンまたは透過剤A - 7による透過（例えば、米国特許第5, 112, 596号、第5, 268, 164号、第5, 506, 206号、および5, 686, 416号参照）、ならびに抗体またはその断片をコードする遺伝子を含むベクターとの血液 - 脳障壁をまたぐニューロンのトランスフェクション（例えば、米国特許公開第2003/0083299号を参照）が挙げられる。

30

40

【0167】

血液 - 脳障壁を越えてA D治療薬を輸送する脂質に基づく方法としては、限定されないが、A D治療薬を、血液 - 脳障壁の血管内皮上の受容体に結合する抗体結合断片に連結するリポソーム内に被包すること（例えば、米国特許出願公開第20020025313号を参照）、およびA D治療薬を低密度リポタンパク質粒子（例えば、米国特許出願公開第

50



20040204354号を参照)またはアポリポタンパク質E(例えば、米国特許出願公開第20040131692号を参照)でコーティングすることが挙げられる。

【0168】

血液-脳障壁を越えてAD治療薬を輸送する受容体に基づく方法としては、限定されないが、血液-脳障壁において発現した受容体を認識するリガンドへのAD治療薬の共役が挙げられ、受容体媒介性トランスサイトシス後にそれらを血液-脳障壁を越えて運ぶ(Gabathuler(2010)Neurobiology of Disease 37;48-57)。これらのリガンドとしては、限定されないが、脳毛細血管内皮受容体、例えば、トランスフェリン受容体もしくはインスリン受容体に対するモノクローナル抗体、ヒストン、ビオチン、葉酸、ナイアシン、パントテン酸、またはグリコペプチドのリガンドが挙げられる。

10

【0169】

AD治療薬を投与するための有効な用量およびスケジュールは、経験的に決定されてよく、このような決定を行うことは、当該技術分野における技術の範囲内である。単回投与または複数回投与が用いられてもよい。AD治療薬のインピボ投与が用いられるとき、投与の経路に応じて、正常な用量は、哺乳類の体重1kg当たり約10ng~最大100mg以上、好ましくは、1日当たり約1μg/kg~10mg/kgで異なり得る。送達の特定の用量および方法に関する案内は、文献において提供され、例えば、米国特許第4,657,760号、第5,206,344号、または第5,225,212号を参照されたい。

20

【0170】

さらに追加の療法がこの方法において用いられ得ることが企図される。1つ以上の他の療法としては、限定されないが、追加のAD治療薬、例えば、コリンエステラーゼ阻害薬、メマンチン、抗興奮薬、抗うつ薬、抗不安薬、またはアミロイド前駆体タンパク質、アミロイド、アミロイドプラーク、もしくは限定されないが、 $\alpha$ -セクレターゼ、 $\beta$ -セクレターゼ、および $\gamma$ -セクレターゼ等を含む、アミロイド前駆体タンパク質を切断する酵素のいずれかの投与が挙げられ得る。

【0171】

キット

本明細書において説明または示唆される用途で用いるために、製造者のキットまたは物品も提供される。このようなキットは、厳重な管理下で、バイアル、管等の1つ以上の容器手段を受容するように区分化された担体手段を備えてよく、容器手段のそれぞれは、この方法において用いられる別個の要素のうちの一つを含む。例えば、容器手段のうちの一つは、検出可能に標識されるか、または標識され得るプローブを備えてよい。このようなプローブは、本明細書において開示されるADと関連付けられる遺伝的変異を含むポリヌクレオチドに特異的なポリヌクレオチドであってよい。キットが核酸ハイブリダイゼーションを用いて標的核酸を検出する場合、キットは、標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチド(複数可)を含む容器、および/または酵素、蛍光、もしくは放射性同位元素標識等のレポーター分子に結合されるアビジンもしくはストレプトアビジン等のビオチン結合タンパク質等のレポーター手段を含む容器も有し得る。

30

40

【0172】

他の実施形態では、このキットは、本明細書において開示されるADと関連付けられる遺伝的変異を含むポリヌクレオチドを検出することができる標識薬剤を含み得る。このような薬剤は、ポリペプチドを結合する抗体であり得る。このような薬剤は、ポリペプチドを結合するペプチドであり得る。このキットは、例えば、本明細書において開示される遺伝的変異型を含むポリペプチドに結合する第1の抗体(例えば、固体支持体に付着される)、およびポリペプチドまたは第1の抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識に共役される、任意に第2の異なる抗体を含み得る。

【0173】

キットは、典型的に、上記の容器と、緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、お

50

よび使用上の指示を伴う添付文書を含む、商業的およびユーザーの視点から望ましい材料を含む1つ以上の他の容器と、を備える。標識は、組成物が特定の治療または非治療的用途に用いられることを示すために容器上に提示され得、上記のもの等のインビボ使用またはインビトロ使用のいずれかに関する指示も示し得る。キットの他の任意の構成要素としては、1つ以上の緩衝剤（例えば、ブロック緩衝剤、洗浄緩衝剤、基質緩衝剤等）、酵素標識により化学的に変化する基質（例えば、クロモゲン）等の他の試薬、エピトープ抽出溶液、対照試料（正および/または負の対照）、対照スライド（複数可）等が挙げられる。

#### 【0174】

マーケティングの方法

本明細書における発明は、ADの診断または予知について開示された方法をマーケティングするための方法も包含し、対象とする顧客層に対して、開示された方法の使用を宣伝すること、指導すること、および/または指定することを含む。

#### 【0175】

マーケティングは、一般に、スポンサーが特定され、メッセージが操作される、非個人的媒体を通じた有料の通信である。本明細書における目的で、マーケティングは、広告、広報、プロダクトプレースメント、スポンサーシップ、引受業務等を含む。この用語は、印刷通信媒体のいずれかにおいて現れる、スポンサー提供の情報公告も含む。

#### 【0176】

本明細書における診断方法のマーケティングは、任意の手段により達成され得る。これらのメッセージを送達するために用いられるマーケティング媒体の例としては、テレビ、ラジオ、映画、雑誌、新聞、インターネット、および広告板を含み、放送メディア内に現れるメッセージである宣伝を含む。

#### 【0177】

用いられるマーケティングの種類は、多くの要因、例えば、届けられる対象とする顧客層の性質、例えば、病院、保険会社、クリニック、医師、看護師、および患者、ならびに経費検討および医薬品および診断のマーケティングを統制する関連管轄法および規則に依存する。マーケティングは、サービス相互作用により定義されるユーザーの特徴、および/またはユーザーの人口学的および地理的位置等の他のデータに基づいて個別化またはカスタマイズされ得る。

#### 【0178】

以下は、本発明の方法および組成物の例である。上で提供される一般的な説明を考慮すると、様々な他の実施形態が実践されてよいことが理解される。

#### 【実施例】

#### 【0179】

実施例1：APOE修飾因子のスクリーニング

アルツハイマー病（AD）の発症に対するAPOEの影響を修飾する変異型を識別するために研究を設計した。この研究設計を図1に示す。65歳未満のADを有する対象から単離されたDNA、したがって恐らくリスク対立遺伝子に対して強化されたDNA（「症例」）を、75または80歳以上のADを有しない、神経学的検査により正常な認知を持つ対象から単離されたDNA、したがって恐らく保護的対立遺伝子に対して強化されたDNA（「スーパー対照」）と比較した。全ての対象は、APOE E4対立遺伝子に対してホモ接合性（E4/E4）またはヘテロ接合性（E3/E4）のいずれかであり、ヨーロッパ系子孫の米国在住者であり、アルツハイマー病全国細胞貯蓄所（NCRAD）から得られた。表1に示されるように、コホート1の症例は、合計31件の非関連E4/E4ホモ接合体症例、および50件の認知症発症年齢55歳超～65歳未満のE3/E4アルツハイマー症例を含んでいた。症例の約3分の1について、ADの診断は剖検により確認した。コホート1のスーパー対照は、19件の80歳以上のE3/E4ヘテロ接合体、および50件の75歳異常のE4/E4ホモ接合体を含んでいた。全対照は、臨床認知症評価法（CDR）スケールがゼロに等しく、最後の訪問で認知障害の証拠を示さなかった。

10

20

30

40

50

試料のAPOE対立遺伝子は、全ゲノム配列決定（ヘテロ接合体の場合）またはエクソーム配列決定（ホモ接合体の場合）により確認した。

【0180】

【表1】

コホート1*		
APOE対立遺伝子	症例(N)	スーパー対照(N)
APOE-ε4/APOE-ε4	31	19
APOE-ε4/APOE-ε3	50	50

\*国立老化研究所(NIA)により付与される共同契約助成(U24AG21886)の下で政府支援を受けて、アルツハイマー病全国細胞貯蓄所(NCRAD)からの試料をこの研究に用いた。この研究において用いられる試料を収集したアルツハイマー病センターを含む寄与者、ならびに支援および参加によりこの研究が可能になったとして、患者およびその家族に感謝する。

10

【0181】

APOEリスクの一般的修飾因子

ゲノム全領域関連走査をコホート1において行い、APOEリスクを修飾する一般的変異型を識別した。コホート1内の対象を、Illumina1M SNP配列を用いて遺伝子型決定した。遺伝子型決定データの品質制御は、Gateva et al.(2009) Nat. Genet. 2009 Nov; 41(11): 1228-1233に記載のとおり行った。コホート1(表1)を発見段階に用いた。ヒト染色体1上のIL6R/SHE/TDR10領域内の一般的変異型は、コホート1の81件のE4+症例対68件のE4+対照において著しい関連を示した(図2)。

20

【0182】

国立老化研究所の遅発型アルツハイマー病家族研究：感受性遺伝子座のゲノム全領域関連研究(dbGAP研究ID: phs000168.v1.p1)について、全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)のウェブサイトにおいて入手可能な遺伝子型および発現型(dbGAP)のデータベースから複製データセットを得た。NIA/LOAD研究は、Illumina610K SNP配列について遺伝子型決定されたヨーロッパ系アメリカ人子孫の932件のAD症例、および836件の対照で構成された。200件のE4ヘテロ接合体およびホモ接合体症例(診断年齢65歳未満)、ならびに144件のE4ヘテロ接合体およびホモ接合体対照(最終訪問時の年齢75歳以上)を選択した。

30

【0183】

表2に示されるように、IL6Rをコードする遺伝子内のSNP(rs2228154)は、発見および複製コホートの両方において、ADと著しく関連付けられることが確認された。多型部位においてCを有するSNP rs2228145の変異型(「C対立遺伝子」)は、対照と比較して、AD症例において優先的に見出された。この対立遺伝子は、IL6R内にアミノ酸置換D358Aを含む。

【0184】

40

## 【表 2】

発見：81件の65歳未満対象ALZ E4+症例対68件の80歳超対象E4+対照

染色体	SNP	対立遺伝子	オッズ比	P
1	rs2228154	C	1.738	0.0087

C対立遺伝子：症例47%、対照31%

複製：200件の65歳未満対象ALZ E4+症例対144件の75歳超対象E4+対照

染色体	SNP	対立遺伝子	オッズ比	P
1	rs2228154	C	1.642	0.0017

C対立遺伝子：症例46%、対照33%

メタP値は $4.7 \times 10^{-5}$ であった。

10

## 【0185】

IL6RのA358変異型対立遺伝子の分布は、NIA/LOAD研究からの932件の非選択AD症例および836件の対照においてさらに検査した。NIA/LOAD対象におけるAPOE多型の臨床評価および遺伝子型決定は、Lee et al., (2008) Arch Neurol. 65:1518-1526において説明されている。図3は、AD症例における発病年齢および対照における年齢により層別された、NIA/LOAD研究からの非選択AD症例および対照におけるrs4129267のT対立遺伝子、rs2228145のC対立遺伝子の代用の頻度を示す。A358変異型対立遺伝子は、対照と比較して、早発型症例においてより頻繁に存在したが、対照と比較して、遅発型症例において低頻度であり、疾患修飾変異型と一致した。

20

## 【0186】

インターロイキン-6受容体(IL6R)は、細胞増殖および分化を調節し、免疫反応において重要な役割を果たす強力な多面的サイトカインである、サイトカインインターロイキン6(IL-6)の受容体である。IL6R A358は、血清IL6Rレベルの増加と関連付けられる共通変異型対立遺伝子である(Galicia et al. (2004) Genes & Immunity 5:513, Marinou et al. (2010) Ann. Rheum. Dis. 69:1191)。A358変異型対立遺伝子は、CRP循環レベルの減少および冠動脈性心疾患リスクの減少(Elliott et al. (2009) JAMA 302:37-48)、ならびに喘息リスクの増加(Ferreira et al. (2011) Lancet 378:1006-1014)と関連付けられている。

30

## 【0187】

IL6R mRNAの発現がADにおいて上昇するか、および/または358位における遺伝子型により影響されるかを検査するために、TGENプロジェクトからのデータ(Webster et al. (2009) Am. J. Hum. Genet. 84:445-458)を分析し、対照と比較して、ADを持つ対象の脳内の膜結合および可溶性IL6Rの両方の発現レベルを比較した。IL6R(NM\_000565)の膜結合形態のみを検出するプローブを用いて、AD内または358位における遺伝子型による強化は観測されなかった。しかしながら、膜結合およびsIL6R(NM\_181359)mRNAの両方を捕捉するプローブを用いて、対照と比較して、AD症例において、脳の側頭部内および358位の遺伝子型による著しい強化が観測された(図4)。

40

## 【0188】

さらに、IL6R領域に対して、表3に列挙される領域は、コホート1およびNIA/LOADデータセットにおいて著しい関連を示し、これらの遺伝子座が、APOEリスクの追加の一般的修飾因子であり得ることを示唆する。

## 【0189】

50

【表 3】

コホート1およびNIA/LOAD研究においてAPOEリスクと関連付けられた領域

SNP	遺伝子	コホート1 (81症例対68対照)				NIA/LOAD (200症例対144対照)			
		Freq_A	Freq_U	OR	P	Freq_A	Freq_U	OR	P
rs12733578	INPP5B	0.19	0.36	0.45	0.00044	0.28	0.38	0.66	0.013
rs4658945	DISC1	0.37	0.24	1.83	0.0058	0.30	0.22	1.46	0.037
rs1478161	OTOLIN1	0.21	0.34	0.48	0.0023	0.26	0.34	0.70	0.035
rs1024591	STAG3L4	0.48	0.34	1.82	0.0032	0.49	0.39	1.53	0.0093
rs7799010	UBE3C/ MINX1	0.50	0.37	1.78	0.0074	0.48	0.40	1.40	0.035
rs10969475	LINGO2/ ACO1	0.52	0.37	1.87	0.0024	0.50	0.41	1.44	0.026
rs12961250	MRLC2	0.40	0.27	1.99	0.0023	0.41	0.33	1.38	0.050
rs225359	TFF1	0.25	0.43	0.44	0.00022	0.30	0.41	0.64	0.0054

## 【0190】

APOE修飾因子のスクリーニングにおける希少変異型

ニューロトロフィン4 (NTF4)

上で開示された共通変異型に加えて、APOE修飾因子スクリーニングは、ADと関連付けられた希少変異型の識別ももたらした。全体集団内で2%未満の対立遺伝子頻度を有する、これらの希少変異型は、NTF4のR206W変異型を含んでいた。NTF4のR206W変異型は、78件のAD症例のうち2件(2.6%)および67件のスーパー対照のうち0件(0.0%)において見出された。さらに、R206W変異型は、試料採取の時点でADを有しない1300人のエクソーム配列決定されたヨーロッパ系アメリカ人( $P = 1.87 \times 10^{-9}$ )において、NHLBIエクソーム配列決定プロジェクト(ESP)エクソーム変異型サーバーから得られたデータを用いて観測されなかった。

## 【0191】

NTF4のR206W変異型は、染色体19上のSNP rs121918427の部位におけるCからTへの置換から生じる。ニューロトロフィン4は、哺乳類ニューロンの生存および分化を制御する、神経栄養因子、ニューロトロフィン(NT)のファミリーメンバーである。ニューロトロフィン4は、特定のチロシンキナーゼ受容体、Trkを担持するニューロンのサブセットの維持、増殖、および分化に関与する。NTによるTrk活性化は、プログラム細胞死の否定を通じてニューロンの生存を促進する(Robinson et al. (1999) Protein Sci. 8: 2589-2597)。NTF4は、末梢ニューロンおよび交感神経ニューロンの生存を促進し、TrkおよびTrkBの両方を活性化する(Berkemeier et al. (1991) Neuron 7: 857-866)。

## 【0192】

NTF4 R206W変異型は、対照と比較して、緑内障を持つ対象において過剰であることが以前に報告されている((Passuto et al. (2009) Am. J. Hum. Genet. 85: 447-456)、Liu et al. (2010) Am. J. Hum. Genet. 86: 498-499)。変化した残基は、チンパンジー、イヌ、マウス、およびラットにおける相同分子種の中で高度に保存され、TrkB結合部位

内に位置する。変異型タンパク質は、TrkBを活性化する能力が低減し、神経突起伸長において機能不全を示す。変異型タンパク質は、したがって、ニューロンの生存に影響を有することが予測される(Passuto et al. 上記)。

#### 【0193】

APOE4担体におけるNTF4のこの機能不全R206W変異型と早発型ADとのこの新たに識別された関連は、NTF4経路の活性化が、ADの発症に対して保護的であり得ること、およびTrkB受容体が、ADの治療のための有力な治療法であり得ることを示唆する。

#### 【0194】

##### 実施例2：家族ベースのスクリーニング

Alison Goate (Washington University) との共同によりLO1系統を入手した。LO1系統は、ADの優性遺伝を示唆するパターンを示した。発端者は、5人の兄弟のうち1人であり、うち2人はADも有したが、別の兄弟のAD状態は不明であった。発端者の母親はADを有し、父親は有していなかった。発端者の片親が異なる兄弟、別の配偶者による発端者の父親の子供はADを有していなかった。発端者および兄弟の子供のうち、4人がADを有した。家族におけるAD発病年齢は、58歳から87歳の範囲であった。ノンパラメトリック連鎖分析は、LO1系統の16メンバーから得られたIllumina連鎖配列を用いて収集された遺伝子型データを用いて実行した。NPL連鎖は、QCedデータセットを用いて、MERLINソフトウェアを使用して実行した。LO1系統におけるノンパラメトリック連鎖分析の結果を図5に示し、1.5を超えるNPLロードスコアを持つ3つの領域が観測された。3つの連鎖間隔内の潜在的な原因対立遺伝子を識別するために、発端者に対してエクソーム配列決定を行い(Illuminaショット読取技術)、分析は、1.5を越えるLODスコアを有するNPL連鎖ピークに制限した。新規性(dbSNP内の存在または100ゲノムプロジェクトデータとして定義される)、ヘテロ接合性、および推定機能に基づいて、得られた4,153変異型をランク付けした。別のAD症例(発端者の姪)の遺伝子型は、完全ゲノム配列決定(CGI)を用いて決定し、上位5つの変異型の存在または非存在を決定した。単一変異型はこの過程により識別され、染色体4内に位置する。この変異型の存在または非存在は、発端者、発端者の母親、3人の兄弟、および発端者および兄弟全員の子供を含む、LO1系統の19人に対して決定した。11人の保有者のうち、8人がADを有したが、その他1人の疾患状態は不明であった。残り2人の保有者は、ADを有していなかったが、75歳未満であった。変異型を欠く8人の家族は誰もADを有していなかった。

#### 【0195】

変異型は、染色体4内のGからAへの置換であることが判明し、UNC5Cをコードする遺伝子内のアミノ酸置換T835Mをもたらす。UNC5Cは、ネトリン受容体のUNC5ファミリーメンバーであり、ネトリン1の受容体である。UNC5Cは、海馬ニューロン内で高度に発現する。UNC5A、B、およびCは、特定の軸索に対するネトリン1の化学反発作用を媒介する。これらの受容体は、それらのネトリン1リガンドに非結合するとき、アポトーシスを誘導する依存受容体でもある。これらの受容体のプロアポトーシス活性は、カスパーゼによる受容体の切断、および細胞内ドメインのC末端内の保存死ドメインの存在に依存する。

#### 【0196】

SIFTプログラム(Ng and Henikoff (2003) Nucleic Acids Res. 31:3812-3814)を用いて、このアミノ酸置換がタンパク質機能に影響することが予想されるか否かを予測した。0.05未満のSIFTスコアは、有害な置換を示す。T835M変異型のSIFTスコアは、0.01であり、この変異型が有害である可能性が高いことを示す。他のUNC5ファミリーメンバーに対する整列(図6)は、この変異型が保存されたモチーフ内に存在することを示す。UNC5タンパク質の構造に基づいて、この変異型は、アポトーシスの下流調節因子と相互作用する領域である、死ドメインとZU5ドメインとの間のヒンジ領域内にある(Williams

10

20

30

40

50

et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:17483-17490)。ネトリン受容体としてのUNC5Cの機能およびその海馬ニューロン内の高い発現を考慮すると、T835M変異型は、UNC5Cの死ドメインが、開いた活性化状態で優先的に見出されるように、UNC5Cシグナル伝達に作用し得、プロアポトーシスシグナル伝達およびニューロン細胞死の増加をもたらす。ADを持つUNC5CのT835M変異型のこの新たに識別された関連は、このUNC5C変異型の異常なアポトーシスシグナル伝達が、ADの治療のための潜在的な治療手法であり得ることを示唆する。

## 【0197】

実施例1に記載されるAPOE修飾因子スクリーニングからのデータを、UNC5CのT385M変異型の存在について評価した。UNC5CのT835M変異型は、2/78 AD症例および1/67対照において観測された。6,000を越える追加の対照の遺伝子型決定は、ヨーロッパ系アメリカ人集団におけるT825Mの集団対立遺伝子頻度が0.00071(9/6315人がT835Mに対してヘテロ接合性)(表4)、AD症例頻度が0.013( $P = 1.5 \times 10^{-7}$ )であることを確立した。このデータは、T835MがADの危険性を増大させる希少変異型であることを示唆する。

## 【0198】

## 【表4】

研究	AD 症例	対立遺伝子頻度	対照	対立遺伝子頻度
APOE 修飾因子のスクリーニング	2/78	0.013	1/67	0.0074
NF1,MADGC			0/200	0.0
AREDS			6/2763	0.00011
結腸直腸癌			0/235	0.0
EVS (WashU)			1/1350	0.00037
NYCP			1/1700	
複合	2/78	0.013	9/6315	0.000712

## 【0199】

実施例3：A358と可溶性IL6Rレベルの増加との関連

アルツハイマー病脳画像診断先導的研究(ADNI; Weiner, M. W. et al. (2010) Alzheimer's & Dementia 6:202-211)からの291試料に対するデータにおいて、脳脊髄液(CSF)中の可溶性IL6R(sIL6R)レベルとIL6R遺伝子領域内のSNPにおける遺伝子型との間の関連について試験を行った。対象は、Illumina's Human610Quadゲノム全領域SNP配列を用いて遺伝子型決定し、sIL6Rは、Rules Based Medicine(Myriad RBM)により開発されたLuminex免疫測定技術に基づいて、免疫測定パネルを用いて測定した。各SNPにおいて、 $\log(sIL6R)$ の線形回帰は、付加的にコードされるSNP遺伝子型(0、1、または2変異対立遺伝子)上で行い、遺伝子型のエフェクトサイズはゼロであるという帰無仮説を試験した。IL6R遺伝子内の変異型は、CSF中のsIL6Rの増加との著しい関連を示し(図7)、SNP rs4129267、rs2228145の代用との最も強い関連を示した。

## 【0200】

上述のように、SNP rs2228145の変異型は、IL6R内のアミノ酸置換D358Aをもたらす。表5に示されるように、358位におけるIL6R遺伝子型は、CSF中の可溶性IL6Rレベルと相関し、A358変異対立遺伝子の存在は、CSF sIL6Rのより高いレベルと関連付けられる。

## 【0201】

【表5】

IL6R 遺伝子型	CSF sIL6R (平均)	N
D/D 358	0.85 ng/mL	99
D/D 358	1.19 ng/mL	138
A/A 358	1.43 ng/mL	38

## 【0202】

IL6R脱落に対するIL6R内のA358変異型の存在の影響を、インビトロおよびインビボの両方で試験した。インビトロ実験の場合、293T細胞をIL6RのD358またはA358構成体でトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後、媒質を変え、細胞を100nMホルボールミリスチン酸酢酸塩(PMA)で0、30、60、および120分間処理した。治療後に細胞を採取し、IL6R-PE抗体で染色した(BD Pharmingen, Cat. No - 551850)。膜結合IL6RをFACSにより分析した。図8は、PMAによる処理後の連続的な時点における0分時点に対する平均蛍光強度(MFI)率を示す。このデータは、検出される細胞結合IL6Rの量が、野生型D358含有試料内で検出されるものとは対照的に、変異型A358含有試料内で顕著に減少したため、A358変異型が、293T細胞内のIL6Rの脱落の増加をもたらすことを示す。

10

## 【0203】

IL6R内のA358変異型対立遺伝子の存在が、一次T細胞内のIL6Rの脱落の増加ももたらすか否かを決定するための実験も行った。健康なヒトボランティアを、Applied BiosystemsからのTaqMan SNP遺伝子型決定分析(分析ID C\_16170664\_10)を用いて、実時間定量的PCRにより、IL6R SNP rs2228145について遺伝子型決定した。年齢、性別、および人種が一致する一対のホモ接合性ドナー(それぞれ遺伝子型AAおよびCCを持つドナー)からFicoll勾配により末梢血単核細胞(PBMC)を得た。CD4<sup>+</sup>T細胞を、STEMCELL TechnologiesからのEastSep CD4<sup>+</sup>T細胞強化キット(Cat. No. 19052)を製造者により推奨されるように用いて、負の選択により精製した。次に、CD4<sup>+</sup>T細胞を、72時間、RPMI 1640 + 10% FBS + 2-メルカプトエタノール中で培養し、100nM PMAにより60分間処理した。処理後すぐに細胞を採取し、IL6R-PE抗体で染色した(BD Pharmingen, Cat. No - 551850)。膜結合IL6RをFACSにより分析した。図9は、IL6Rの膜結合分画が、PMAによる活性化後、野生型D358 IL6Rとは反対に、A358変異を持つIL6Rを運ぶCD4<sup>+</sup>T細胞内で低いことを示し、A358細胞内の脱落の増加を示す。

20

30

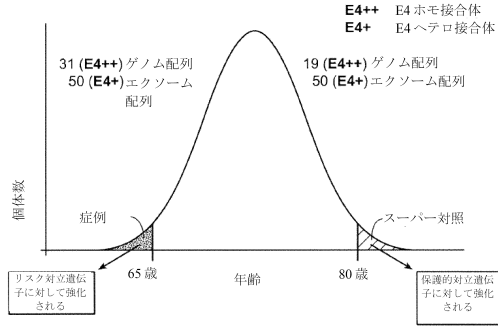
## 【0204】

別の実験では、CD4<sup>+</sup>T細胞を、プレート結合抗hCD3(BD Pharmingen, Cat. No - 555329、10mg/mL)および抗hCD28(BD - Cat No - 555725、5mg/mL)、または同位体対照(BD Pharmingen, Cat No 554721 - 15mg/mL)により活性化した。次に、全RNA抽出のために、24、48、および72時間後に細胞を採取し、上清を回収して、ELISAによりヒトIL-6R Quantikine ELISAキット(R&D Systems, Cat. No. DR600)を用いて決定した。図10は、各時点で、D358に対してA358の可溶性IL6Rにおける倍率増加を示す。可溶性IL6Rの量は、D358について経時的にほぼ一定であったが、A358については実験の経過を通じて4倍増加した。

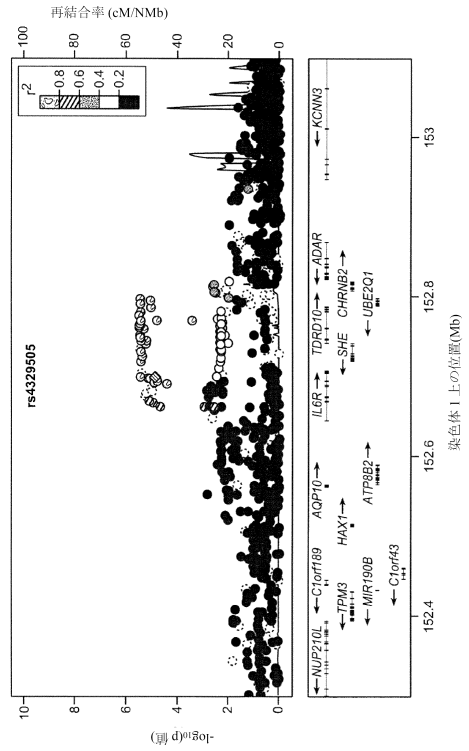
40



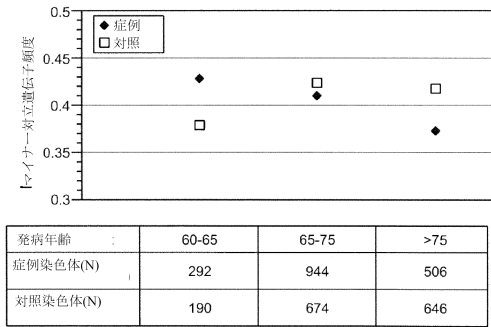
【図 1】



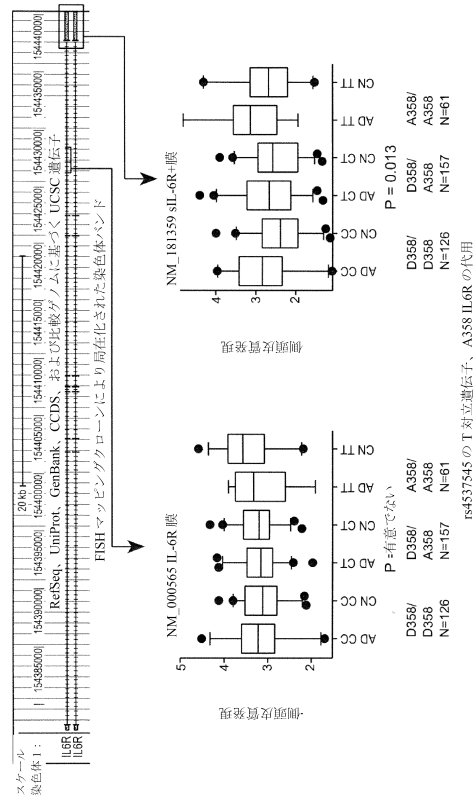
【図 2】



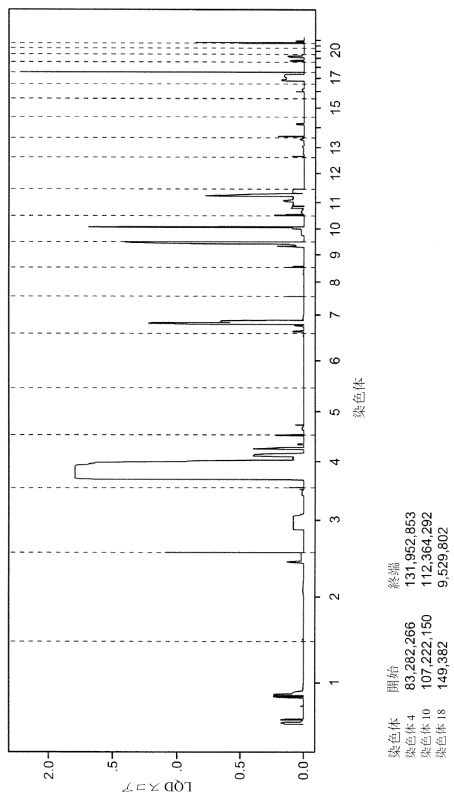
【図 3】



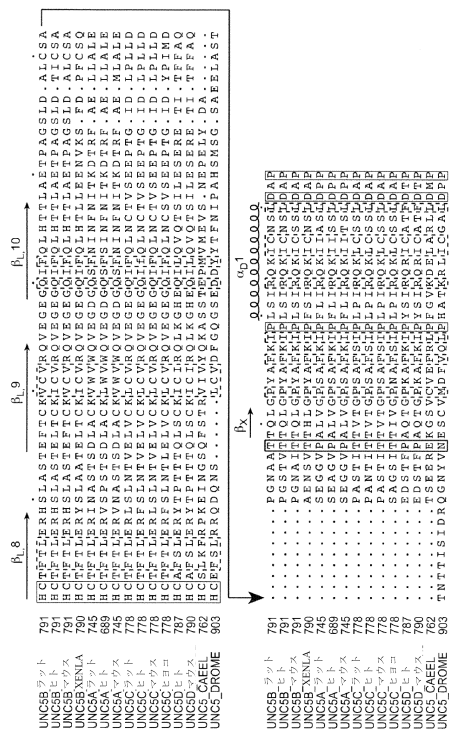
【図 4】



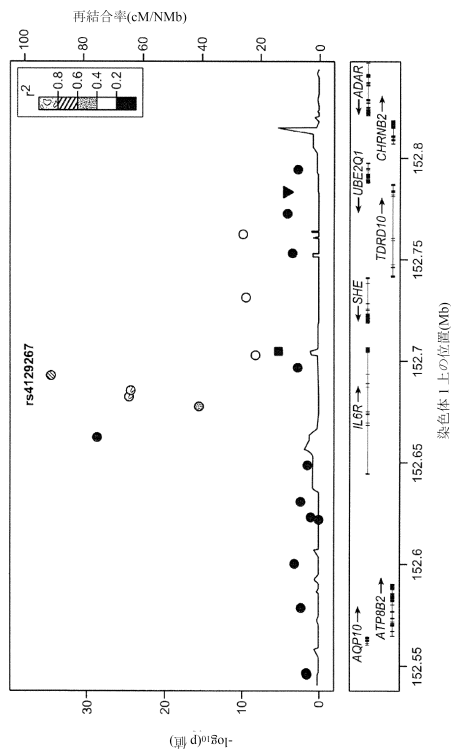
【図5】



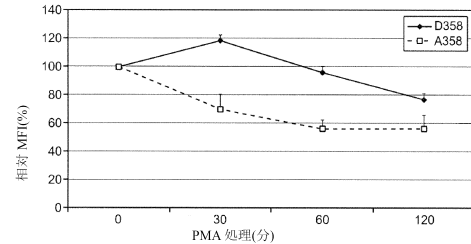
【図6】



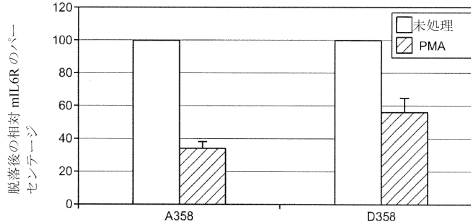
【図7】



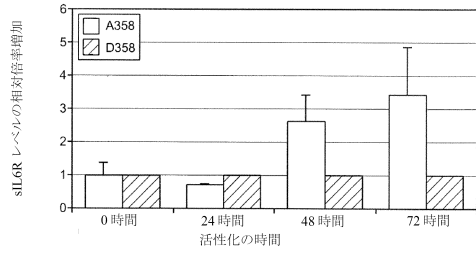
【図8】



【図9】



【図10】



【配列表】

0006338530000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 グレアム, ロバート アール.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー  
ウェイ 1
- (72)発明者 バーンガル, タッシャー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー  
ウェイ 1

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 国際公開第2009/133142(WO, A1)  
Brain Res., 2010, 1327, pp.1-5  
Am. J. Hum. Genet., 2009, 85(4), pp.447-456  
Am. J. Hum. Genet., 2008, 83(5), pp.623-632  
Neuron, 2007, 54(5), pp.713-720  
Hum. Mol. Genet., 2009, 18(R2), R137-145

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/00 - 15/90  
C12Q 1/68  
CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)