

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年6月21日(21.06.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/081433 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/078036
- (22) 国際出願日: 2011年12月5日(05.12.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-280331 2010年12月16日(16.12.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 北海道公立大学法人 札幌医科大学(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600061 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小海 康夫 (KOKAI Yasuo) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 相馬 仁 (SOUMA Hitoshi) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 今井伸一 (IMAI Shinichi) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 松本圭代 (Matsumoto Kayo) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地 北海

道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 木村 成寿 (KIMURA Michitoshi) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: BIOMARKER FOR AMYLOID-B-RELATED NEUROLOGICAL DISORDERS

(54) 発明の名称: アミロイドβ神経障害バイオマーカー

(57) Abstract: To provide a novel biomarker for use in the examination of amyloid-β-related neurological disorders such as Alzheimer's disease. [Solution] A method for examining Alzheimer's disease characterized by measuring the level of MFG-E8 protein in a blood, serum or plasma sample obtained from a subject person or animal and using the obtained measurement as an index for diagnosing Alzheimer's disease is disclosed. MFG-E8 protein was found as a protein binding to phosphatidylserine in a Ca²⁺-dependent manner in the supernatant of culture of cerebral neurons of a mouse model of dementia stimulated with Aβ₄₂. Further, it was revealed that the level of MFG-E8 protein increases in patients with Alzheimer's disease.

(57) 要約: アルツハイマー病などのアミロイドβ神経障害を検査するための新規なバイオマーカーを提供すること。【解決手段】アルツハイマー病を検査するための方法であって、被験者または被検動物から得た血液、血清または血漿試料中のMFG-E8蛋白質の量を測定し、得られた測定値をアルツハイマー病の診断の指標とすることを特徴とする方法が開示される。MFG-E8蛋白質は、Aβ₄₂で刺激を与えた認知症モデルマウス脳神経細胞の培養上清中に、Ca²⁺依存的にホスファチジルセリンに結合する蛋白質として見いだされた。さらに、アルツハイマー病患者においてMFG-E8蛋白質のレベルが上昇していることが明らかになった。



WO 2012/081433 A1

明 細 書

発明の名称：アミロイド β 神経障害バイオマーカー

技術分野

[0001] 本発明は、アルツハイマー病などのアミロイド β 神経障害を検査するためのバイオマーカーに関する。

背景技術

[0002] アルツハイマー病は進行性の神経変性疾患であり、 β アミロイドと呼ばれる不溶性繊維状蛋白質の脳内の蓄積により特徴付けられる。アルツハイマー病の診断方法としては、脳脊髄液中の特定の蛋白質の検出、血液中の特定の蛋白質やリポ蛋白質の検出、遺伝子多型を含む遺伝的変異の検出など、様々な方法が提案されている。しかしながら、これまでのところ、末梢血を用いる簡便・有効な診断方法は実用化されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：J Neuroimmune Pharmacol (2008) 3:246-256

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明の目的は、アルツハイマー病などのアミロイド β 神経障害を検査するための新規なバイオマーカーを提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、脳生体膜を模倣した磁性ナノリポソームを用いて、認知症モデルであるマウス初代神経培養細胞の培養上清中に存在するタンパク質群を探索したところ、 Ca^{2+} 依存的にホスファチジルセリンに結合する蛋白質としてMFG-E8が同定された。さらに、アルツハイマー病患者においてMFG-E8蛋白質のレベルが上昇していることを発見し、MFG-E8がアルツハイマー病のバイオマーカーとなりうることを見いだした。

[0006] すなわち、本発明は、アルツハイマー病を検査するための方法であって、

被験者または被検動物から得た血液、血清または血漿試料中のMFG-E8蛋白質の量を測定し、得られた測定値をアルツハイマー病の診断の指標とすることを特徴とする方法を提供する。好ましくは、アルツハイマー病はアミロイドβ蛋白質の蓄積が進行していない段階で診断される。また好ましくは、MFG-E8蛋白質の量は抗MFG-E8抗体を用いて測定される。

[0007] 本発明はまた、抗MFG-E8抗体を含むアルツハイマー病の検査薬を提供する。本発明はさらに、抗MFG-E8抗体と、抗MFG-E8抗体と結合したMFG-E8蛋白質を検出するための試薬とを含むアルツハイマー病の検査キットを提供する。

[0008] 別の態様においては、本発明は、アルツハイマー病の治療薬の候補物質を選択する方法を提供する。この方法は、アルツハイマー病のモデル細胞またはモデル動物に試験物質を投与し、前記モデル細胞の培養液中または前記モデル動物から得た試料中のMFG-E8蛋白質の量を測定し、そして、試験物質を投与したときに投与していないときと比較してMFG-E8蛋白質の量が低い場合に、その試験物質をアルツハイマー病の治療薬の候補物質として選択する、の各工程を含む。

発明の効果

[0009] 本発明にしたがえば、アルツハイマー病の発症を簡便な方法により検査することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、マウスおよびヒトMFG-E8の構造を示す。

[図2]図2は、培養上清中のCa²⁺依存的にナノリポソームに結合する分画のSDS-PAGEの結果を示す。

[図3]図3は、ウエスタンブロットによるMFG-E8の発現量の測定の結果を示す。

[図4]図4は、健常老人対AD患者の血漿中MFG-E8濃度のROC曲線を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、被験者の血液などの被検試料におけるMFG-E8の発現量を測定することにより、アルツハイマー病を診断する方法を特徴とする。

[0012] MFG-E8 (Milk fat globule EGF

factor 8) は、lactadherin;P47;Mfgm;SED1などとも呼称される分泌タンパク質であり (GenBank No. NP_032620.2, IPI No. IPI00788387.1)

、2つの機能的ドメインを持つ (N末端にEGFドメイン、C末端にC2ドメイン)。これはL型 (72kDa, 61kDa) とS型 (56kDa, 48kDa) のアイソフォームを持ち、L型が分泌タイプであると報告されている (図1)。

[0013] MFG-E8は、多くの組織でアポトーシスに陥った細胞を貪食するのに貢献する。MFG-E8は、末梢血において、アポトーシス細胞のeat-meシグナルをマクロファージに伝え、マクロファージの貪食作用を促進し、過剰量で貪食作用を競合阻害するという、アポトーシス細胞貪食の重要な調節因子であることが知られている。これはアポトーシス細胞表面のPSに結合し、マクロファージ上のインテグリンとも結合して、アポトーシス細胞のマクロファージによる除去、授乳期が終わった乳腺の退縮、網膜色素上皮が脱落した視細胞外節膜の貪食、アテローム硬化性の血管内アポトーシス細胞のデブリスのクリアランスなどに関与している。また、MFG-E8は、細胞間相互作用を促進することが知られており、精子と卵子の結合、精巣上皮の維持、腸上皮補修、腺管の枝分かれを促進、血管新生、樹状細胞のエキソソーム機能の促進などに関与している。

[0014] Fullerら (J Neuroimmune

Pharmacol (2008) 3:246-256) は、ミクログリア由来細胞株を用いてMFG-E8の動態を調べ、脳内においてはミクログリア細胞がMFG-E8を産生し、MFG-E8がアポトーシスを起こした神経芽腫細胞を認識して、貪食において役割を果たす可能性を報告している。これは、末梢血においてマクロファージがMFG-E8を産生し、MFG-E8がアポトーシスを起こした細胞を認識してこれをマクロファージに伝える機能と対応するものと考えられる。一方、Fullerらはさらに実験を重ねた結果、ヒト家族性アルツハイマー病のAPP遺伝子を有するTGマウス (アルツハイマーモデルマウス) では、正常マウスと比較して脳内のMFG-E8のレベルが低下していることを見いだした。このことに関しては、M

FG-E8の制御の乱れがアルツハイマー病の進行に何らかの役割を果たしているのではないかと解釈している。同様に、Boddaert Jら (Am J Pathol (2007) 170:921-929) も、アルツハイマー病の脳において同年齢の脳に比べMFG-E8の mRNA発現が低下している事実を示している。

[0015] これに対し、本発明者らは、免疫染色によって、正常マウス脳（12ヶ月齢）ではA β およびMFG-E8の蓄積が全く確認されないこと、およびアルツハイマーモデルマウス脳（12ヶ月齢）において、A β 蓄積部位に一致してMFG-E8が蓄積していることを発見した。FullerらやBoddaertらと発明者らとで全く逆の結果が得られたことになるが、その原因としては、使用した抗体の違いも一部考えられるものの、詳細は不明である。発明者らはこの発見に先立ち、下記実施例に具体的に示されるように、アルツハイマー病の患者において、末梢血液中のMFG-E8のレベルも有意に高いことを見出し、本発明を完成させた。末梢血液中のMFG-E8については、A β 蓄積部位に一致して蓄積した上記MFG-E8が漏れ出して観察された可能性も考えられる。しかし、アルツハイマー病の患者で血液脳関門における血液から脳への透過性が亢進していることを示唆する研究は確かに散見されるものの、その程度は限定的であり、かつ、脳から血液への透過については全く不明である。したがって、A β 蓄積部位において観察されたような上記MFG-E8が、血液脳関門を超えて血液中のMFG-E8の濃度に直接影響を及ぼすことは考えにくい。本発明において見いだされたMFG-E8のレベルの上昇とアルツハイマー病との相関の詳細なメカニズムは現在のところ不明である。

[0016] MFG-E8蛋白質の量を測定すべき被検試料としては、被験者または被検動物から得た体液、血液、血清、血漿などを用いることができる。ただし、上述の理由により脳脊髄液は試料として適していない。

[0017] 被験者から得た試料におけるMFG-E8蛋白質の量は、抗MFG-E8抗体を用いて、当該技術分野においてよく知られる免疫学的測定法を用いて測定することができる。抗MFG-E8抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。各種の抗MFG-E8ポリクローナル抗体およびモノクローナ

ル抗体が市販されており、それらのいずれの抗体も本発明において用いることができる。あるいは、抗体は当該技術分野においてよく知られる方法により作成してもよい。

[0018] 抗MFG-E8抗体を用いて、免疫学的方法により、被験者または被検動物から得た試料中のMFG-E8蛋白質を測定する。測定は、定性的であっても定量的であってもよい。被験者から得たMFG-E8の発現の免疫学的測定は、例えば、ラジオイムノアッセイ、ELISA、イムノクロマト法、免疫沈降法、免疫凝集法、ウエスタンブロット等を用いて行うことができる。あるいは、表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを用いて行ってもよい。

[0019] 例えば、典型的な例として、以下のようにしてサンドイッチELISAを行うことができる。被験者の末梢血を採血して血漿を調製し、これを抗MFG-E8抗体を固定化したプレートまたはチップに加え、適当な時間インキュベートする。プレートまたはチップを洗浄して未結合成分を除去した後、別の抗MFG-E8抗体を加える。この抗体は、酵素、蛍光色素、化学発光物質、ビオチン、放射線化合物等により検出可能なように標識することができる。適当な時間インキュベートした後、プレートまたはチップを洗浄し、蛍光、発光、放射活性等を測定することにより、標識を検出する。あるいは、抗MFG-E8抗体を結合させた後、二次抗体（例えばヤギ抗マウス抗体）を加えてシグナルを増強してもよい。二次抗体は、酵素、蛍光色素、化学発光物質、ビオチン、放射線化合物等により検出可能なように標識することができる。このようにして、被験者から得た血漿におけるMFG-E8蛋白質の量を測定することができる。

[0020] 別の態様においては、凝集反応を利用した検出方法を用いてMFG-E8蛋白質を検出することができる。この方法においては、抗MFG-E8抗体を結合させた担体、例えばラテックス粒子を用いてMFG-E8を検出することができる。抗MFG-E8抗体を結合させたラテックス粒子を試料と混合して一定時間インキュベートすると、試料中にMFG-E8が含まれる場合には粒子が凝集する。この凝集の程度を肉眼で観察するか、または分光光度計を用いて定量することにより、

試料中のMFG-E8を検出することができる。

- [0021] 本発明はまた、抗MFG-E8抗体を含むアルツハイマー病検査薬を提供する。本発明のアルツハイマー病検査薬は、検査キットの形で提供することができる。検査キットは、MFG-E8の検出のための試薬、例えば、抗MFG-E8抗体を有効成分として含む。また、このキットは、測定に必要な適当な試薬類、例えば緩衝液、希釈液、反応停止液、洗浄液、コントロール標品などをさらに含んでいてもよい。
- [0022] 本発明においては、このようにして測定されたMFG-E8蛋白質の量を指標として、アルツハイマー病の検査を行うことができる。具体的には、被験者または被検動物から得た試料中のMFG-E8蛋白質の量を測定し、得られた測定値を健常な対照の測定値と比較して、得られた測定値が対照の測定値より高い場合に、その被験者または被検動物はアルツハイマー病に罹患している可能性が高いと診断される。また、本発明の方法を用いてアルツハイマー病の経過をモニタリングしてもよい。被験者または被検動物から複数の時点で得た試料中のMFG-E8蛋白質の量を測定し、得られた測定値が時間とともに上昇していることはアルツハイマー病の進行を示し、低下していることはアルツハイマー病の改善を示す。この方法により治療の経過をモニタリングして、治療効果を判定してもよい。
- [0023] 本発明の方法にしたがえば、脳脊髄液を採取することなく、血液中のMFG-E8蛋白質をマーカーとして、アルツハイマー病を診断することができる。下記の実施例において示されるように、アルツハイマー病を発症している患者における血漿中のMFG-E8の発現量は、健常な対照者と対比して有意に上昇している。本発明の検査方法は、例えば、アルツハイマー病の早期診断（初期の、アミロイドβ蛋白質の蓄積が進行していない段階での診断）、発症の確定診断、疾患の経過のモニタリング、治療効果の判定、および予後の予測に有用である。
- [0024] さらに、本発明にしたがって、MFG-E8蛋白質の発現量を指標として、アルツハイマー病の治療薬の有効な候補物質をスクリーニングすることが可能で

ある。スクリーニングは、アルツハイマー病のモデル細胞またはモデル動物、例えば $A\beta_{42}$ ペプチドで細胞障害を与えたマウス初代神経培養細胞やTGマウスに試験物質を投与し、モデル細胞の培養液またはモデル動物から得た試料中のMFG-E8蛋白質の量を測定することにより行う。試験物質としては、各種の合成化学物質や、抗体を用いることができる。試験物質は、例えば、種々の合成又は天然の化合物ライブラリー、コンビナトリアルライブラリー、オリゴヌクレオチドライブラリー、ペプチドライブラリー等のライブラリーから取得することができる。また、細菌、真菌類、藻類、植物、動物等の天然物からの抽出物やその部分精製物を試験物質として用いてもよい。試験物質を投与したときに投与していないときと比較してMFG-E8蛋白質の量が低い場合には、その試験物質をアルツハイマー病の治療薬の候補物質として選択することができる。すなわち、本発明の検査方法は、アルツハイマー病の新規治療法開発におけるプラットフォームを提供するものである。

[0025] 以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例 1

[0026] アミロイド β ($A\beta$) 神経障害バイオマーカーの探索

認知症のモデルとして、 $A\beta_{42}$ ペプチドで細胞障害を与えたマウス初代神経培養細胞を用い、脳生体膜を模倣した磁性ナノリポソームを用いて、アミロイド β 神経障害バイオマーカー候補を探索した。 $A\beta_{42}$ はアミロイドプリカーサプロテイン：APP (150KD)から3種類の酵素で切断されてできる最終産物のなかの一つであり、最も細胞毒性が強く、多くの研究で使用されているものである。

[0027] マウス終脳初代培養細胞 ($5 \times 10^6/10\text{ml}$ シャーレ) を $A\beta_{42}$ ($0.1 \mu\text{M}$) で24時間刺激した。条件としては、細胞障害を軽度に抑えるため、またアルツハイマー初期の状態も想定して、低濃度短時間とした。すなわち細胞壊死やアポトーシスが起きない濃度として $0.1 \mu\text{M}$ 、時間は24時間を選択した。コントロールとしては $A\beta_{42}$ で刺激していない細胞を用いた。細胞培養上清をEGTA (

終濃度5mM) で処理した後に一定量プールし、アミコンウルトラ153000NMWLを用いて限外濾過により10mlから1mlへ濃縮した。次に、濃縮上清へナノリポソーム1mgとCaCl₂ (終濃度10mM) を加え、0.5M HEPES(pH 7.5)にてpHを調整し、4°C、1.5時間ローターで反応させた。反応後EGTAでCa²⁺をキレートし、ナノリポソームとタンパク質を分離し、Ca²⁺依存的に酸性リン脂質 (ホスファチジルセリン) に結合する分画を得た。

[0028] 試料とリポソームをカルシウムイオンの存在下に混合し、キレート剤を用いてリポソーム結合性蛋白質を分離する方法の原理と詳細な手順は、特開2008-020383に記載されるとおりである。また、ナノリポソームは、温度応答性の高分子とリン脂質により表面を修飾した磁性微粒子であり、水溶液中でリポソーム様構造体を形成することができる。ナノリポソームの原理および構造は特開2010-066200に詳細に説明されている。このナノリポソームと試料を水性溶液中で混合すると、試料中のリン脂質結合性成分がナノリポソームに結合するので、温度変化と磁気を利用してナノリポソームを回収することにより、リン脂質結合性成分を容易に回収することができる。

[0029] ここでは、リン脂質としてホスファチジルセリンを用いた。ホスファチジルセリンは細胞膜を構成する脂質の1つであるが、通常は細胞膜の内側に存在しており、細胞がアポトーシスをおこすと細胞外に露出される。従って、ホスファチジルセリンに結合するタンパク質をスクリーニングすれば、アポトーシス関連タンパク質をスクリーニングできると考えられる。

[0030] このようにして得られた、培養上清中のCa²⁺依存的にナノリポソームに結合する分画を、一次元SDS-PAGEで分離し、銀染色した。結果を図2に示す。

[0031] 次に、図2中の矢印の位置でゲルを10画分に分割し、トリプシンによるゲル内消化を行ってペプチドを回収し、質量分析により解析した。同定されたナノリポソーム結合タンパク質のうち上位100個中、Aβ刺激により発現量が増加したと考えられるものを解析したところ、マーカー候補タンパク質としてMFG-E8 (milk fat globule-EGF factor 8 protein isoform 1) が同定された。

実施例 2

[0032] ウェスタンブロットによる解析

次に、ウェスタンブロットにてタンパク質レベルでのMFG-E8の発現量の差を確認した。

[0033] 材料としては、質量分析の解析に用いたものとは別のロットの培養上清から得られたPS100%ナノリポソーム結合分画を用いた。電気泳動 (Bio Rad Ready Gel (5-15%)) した後、PVDF膜に転写した (9V, 16.5時間(約150Vhr))。1次抗体としてハムスター抗マウスMFG-E8抗体 (MBL社) を $1\mu\text{g/ml}$ で2時間(室温)反応させ、2次抗体としてHRPコンジュゲート化ヤギ抗ハムスターIgG (サンタクルーズ社) を1000倍希釈濃度で1時間(室温)反応させた。検出はPIERCE社感光試薬を用い、感光時間は3分間とした。

[0034] 図3に結果を示す。得られたシグナルは、その分子量からMFG-E8ロングフォーム(アイソフォーム1)と考えられる。 $A\beta 42$ ($0.1\mu\text{M}$) で刺激したサンプルのレーンにコントロール(無刺激)よりも濃いMFG-E8のバンドが検出されたことより、タンパク質のレベルでも有意差があることが確認できた。

実施例 3

[0035] アルツハイマー病患者血漿中のMFG-E8濃度の測定

アルツハイマー病(AD)患者および年齢の対応した健常老人の血漿中のMFG-E8濃度を、ELISAにより測定した。

[0036] 健常老人20例、AD患者20例からの血漿を調製し、抗MFG-E8抗体を用いて、ELISA Kit for Human Milk Fat Globule EGF Factor 8(USCN社)によりキットの説明書通りの手順でELISAを行った。サンプルの希釈は10倍希釈とした。濃度測定後、JMPで統計解析を行った。

[0037] 図4に、健常老人対AD患者血漿中MFG-E8濃度のROC曲線 (ADを陽性とした)を示す。ROC曲線の下面積は0.72000であり、有意差があることが示された。

[0038] これらの結果から、MFG-E8は、 $A\beta 42$ で刺激を与えたマウス脳神経細胞培養液中に存在し、健常人と比較してAD患者血漿中により多く検出されたことが

示された。

産業上の利用可能性

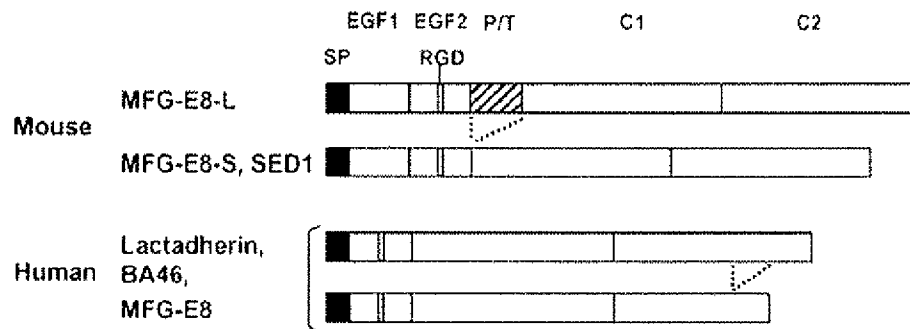
[0039] 本発明は、アルツハイマー病の診断に有用である。

請求の範囲

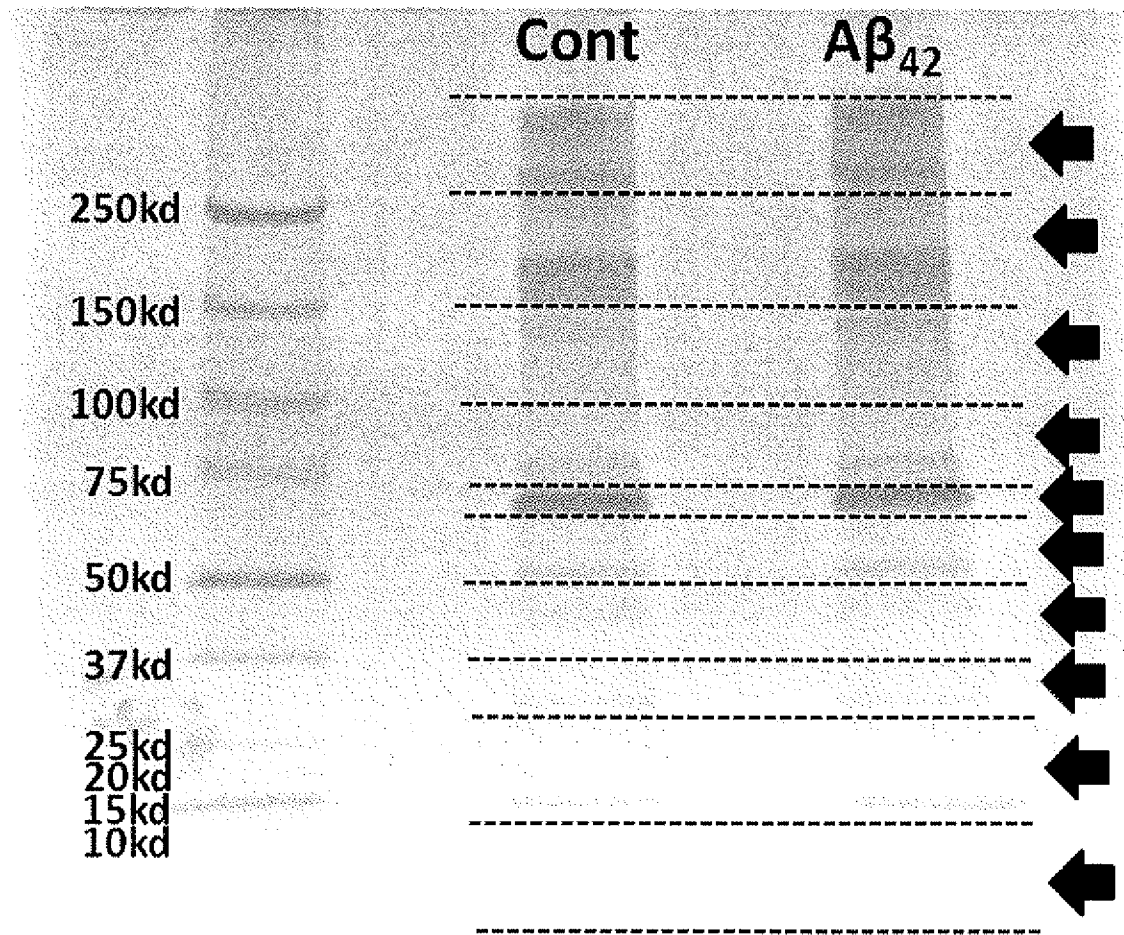
- [請求項1] アルツハイマー病を検査するための方法であって、被験者または被検動物から得た血液、血清または血漿試料中のMFG-E8蛋白質の量を測定し、得られた測定値をアルツハイマー病の診断の指標とすることを特徴とする方法。
- [請求項2] アミロイド β 蛋白質の蓄積が進行していない段階でアルツハイマー病が診断される、請求項1記載の方法。
- [請求項3] MFG-E8蛋白質の量が抗MFG-E8抗体を用いて測定される、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 抗MFG-E8抗体を含むアルツハイマー病の検査薬。
- [請求項5] 抗MFG-E8抗体と、抗MFG-E8抗体と結合したMFG-E8蛋白質を検出するための試薬とを含むアルツハイマー病の検査キット。
- [請求項6] アルツハイマー病の治療薬の候補物質を選択する方法であって、アルツハイマー病のモデル細胞またはモデル動物に試験物質を投与し、
前記モデル細胞の培養液中または前記モデル動物から得た試料中のMFG-E8蛋白質の量を測定し、そして、
試験物質を投与したときに投与していないときと比較してMFG-E8蛋白質の量が低い場合に、その試験物質をアルツハイマー病の治療薬の候補物質として選択する、
の各工程を含む方法。

[図1]

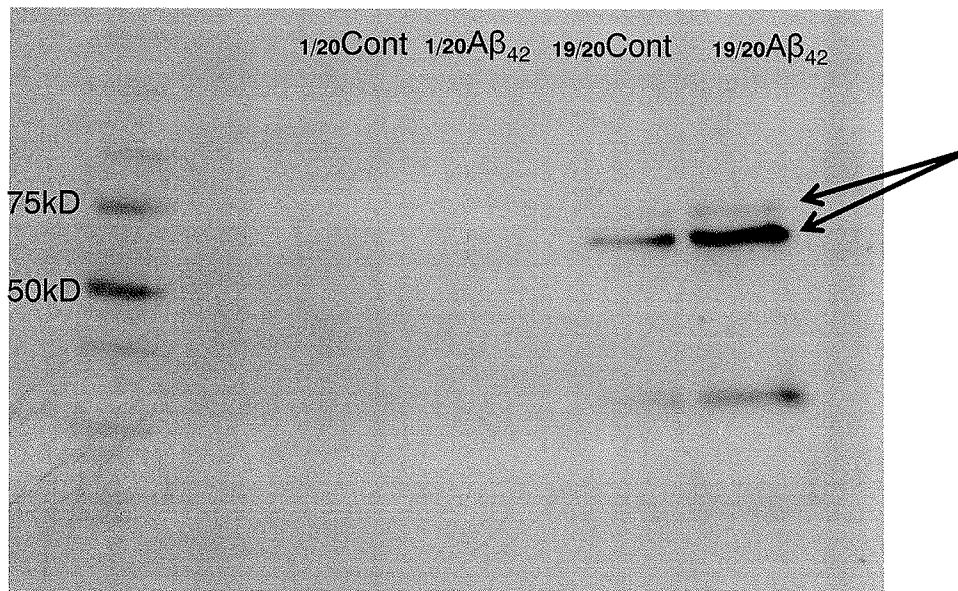
マウスとヒトのMFGE8ドメイン構造の比較



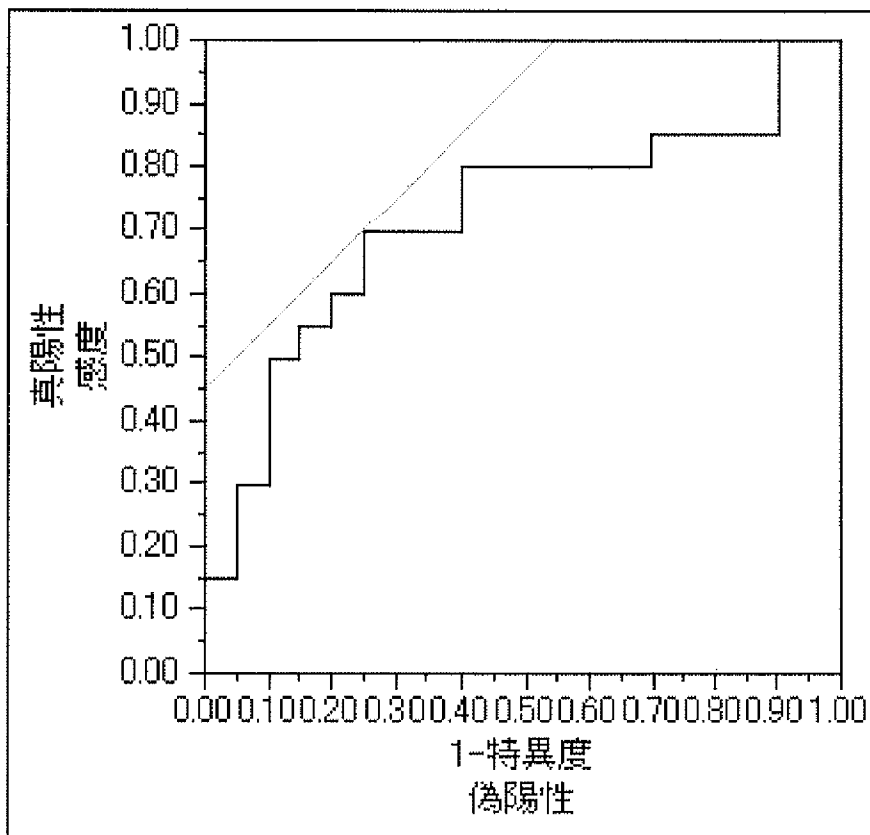
[図2]



[圖3]



[圖4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078036

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G01N33/68(2006.01) i, G01N33/15(2006.01) i, G01N33/50(2006.01) i, G01N33/53(2006.01) i</i>												
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) <i>G01N33/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53</i>												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table border="0"> <tr> <td>Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1922-1996</td> <td>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td>1996-2011</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2011</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2011</td> </tr> </table>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011		
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011									
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011									
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A/X	Boddaert J. et al., Evidence of a role for lactadherin in Alzheimer's disease., Am.J. Pathol., 2007, Vol.170(3), p.921-9	1-3, 6/4, 5										
A	Spitsberg VL., Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical., J Dairy Sci., 2005, Vol.88(7), p.2289-94	1-6										
A	Fuller A.D. et al., MFG-E8 Regulates Microglial Phagocytosis of Apoptotic Neurons, J Neuroimmune Pharmacol., 2008, Vol.3(4), p.246-256	1-6										
A	Raymond A. et al., SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions., J Cell Biochem., 2009, Vol. 106(6), p.957-66	1-6										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>“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</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>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>“&” document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></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 application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family	“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
“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 application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family											
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 16 December, 2011 (16.12.11)		Date of mailing of the international search report 27 December, 2011 (27.12.11)										
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer										
Facsimile No.		Telephone No.										

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2011年 日本国実用新案登録公報 1996-2011年 日本国登録実用新案公報 1994-2011年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A/X	Boddaert J. et al., Evidence of a role for lactadherin in Alzheimer's disease., Am. J. Pathol., 2007, Vol.170(3), p.921-9	1-3, 6/4, 5
A	Spitsberg VL., Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical., J Dairy Sci., 2005, Vol.88(7), p.2289-94	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 16. 12. 2011	国際調査報告の発送日 27. 12. 2011	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 白形 由美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 3 4 9 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Fuller A. D. et al., MFG-E8 Regulates Microglial Phagocytosis of Apoptotic Neurons, J Neuroimmune Pharmacol., 2008, Vol.3(4), p. 246-256	1-6
A	Raymond A. et al., SEDI/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions., J Cell Biochem., 2009, Vol.106(6), p. 957-66	1-6