

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6611753号  
(P6611753)

(45) 発行日 令和1年11月27日(2019.11.27)

(24) 登録日 令和1年11月8日(2019.11.8)

(51) Int.Cl.

F 1

G O 1 N 33/573 (2006.01)

G O 1 N 33/573

33/573

A

G O 1 N 33/536 (2006.01)

G O 1 N 33/536

33/536

C

C 1 2 N 9/04 (2006.01)

C 1 2 N 9/04

9/04

C

請求項の数 12 外国語出願 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2017-80646 (P2017-80646)  
 (22) 出願日 平成29年4月14日 (2017.4.14)  
 (65) 公開番号 特開2018-72313 (P2018-72313A)  
 (43) 公開日 平成30年5月10日 (2018.5.10)  
 審査請求日 平成30年4月3日 (2018.4.3)  
 (31) 優先権主張番号 15/335,036  
 (32) 優先日 平成28年10月26日 (2016.10.26)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

(73) 特許権者 517134618  
 バイオーステム・バイオテック・カンパニー・リミテッド  
 Bio-System Biotech Co., Ltd.  
 台湾260イーラン・カウンティ、イーラン・シティ、メイジョウ・ファースト・ロード、ナンバー14-3  
 (74) 代理人 100101454  
 弁理士 山田 阜二  
 (74) 代理人 100062144  
 弁理士 青山 葉  
 (74) 代理人 100106518  
 弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アルツハイマー病の診断方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

被験者におけるアルツハイマー病(AD)の診断またはADリスクの検出を補助するための方法であって、以下のステップ：

(1) ADを有さない被験者のコントロールグループならびにアルツハイマー病の異なるステージおよびタイプを有する被験者のADグループを含む被験者のベースラインセット由來のベースラインサンプルにおいて、単一のバイオマーカーとして、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のベースラインレベルを測定するステップ；

(2) ADグループのベースラインセット中のGAPDHのベースラインレベルに基づいて該セット中のGAPDHについての1つ以上のAD基準レベルを同定するステップ；

(3) 被験者からの試験サンプルにおいてGAPDHのレベルを測定するステップ；および

(4) 試験サンプルにおけるGAPDHのレベルが、ステップ(2)で同定されたAD基準レベルよりも高い場合、該被験者がADに対して陽性であるか、またはリスクを有するとの指標を提供するステップ；

ここで、サンプルは血漿サンプルである  
 を含む方法。

## 【請求項2】

GAPDHについてのAD基準レベルが、約380 ng/dL～約720 ng/dLであり；ここで、被験者からの試験サンプルにおけるGAPDHのレベルが、約720 ng/dLより高い場合、アルツハイマー病であると判定され；被験者からの試験サンプルにおけるGAPDHのレベルが、約380 ng/

dLより低い場合、アルツハイマー病のリスクが低いと評価され；および被験者からの試験サンプルにおけるGAPDHのレベルが、約380 ng/dL～約720 ng/dLである場合、アルツハイマー病のリスクが高いと評価される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

GAPDHについてのAD基準レベルが、すべての被験者からのサンプルの特異度データおよびGAPDHレベルの統計データに従って同定される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

GAPDHについてのAD基準レベルが、回帰分析によって同定される、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

サンプルにおけるGAPDHのレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットによって同定される、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

被験者における、アルツハイマー病(AD)の診断またはADリスクの評価を補助するための方法であって、以下のステップ：

(1)被験者からの試験サンプルにおいて、グリセラルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルを測定するステップ；および

(2)被験者からの試験サンプルにおけるGAPDHのレベルを、GAPDHについての1つ以上のAD基準レベルと比較するステップ；および

(3)試験サンプルにおけるGAPDHのレベルが、GAPDHについてのAD基準レベルよりも高い場合、該被験者が、ADに対して陽性であるか、またはリスクを有すると評価されるステップ；

ここで、サンプルは血漿サンプルである

を含む方法。

【請求項7】

GAPDHについてのAD基準レベルが、約380 ng/dL～約720 ng/dLである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

被験者からの試験サンプルにおけるGAPDHのレベルが、約720 ng/dLより高い場合、アルツハイマー病と判定され；被験者からの試験サンプルにおけるGAPDHのレベルが、約380 ng/dLより低い場合、アルツハイマー病のリスクが低いと評価され；および被験者からの試験サンプルにおけるGAPDHのレベルが、約380 ng/dL～約720 ng/dLである場合、アルツハイマー病のリスクが高いと評価される、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】

サンプルにおけるGAPDHのレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットによって同定される、請求項6から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

被験者からの試験サンプルにおける、アルツハイマー病(AD)の診断またはADリスクの評価を補助するための請求項6から9のいずれか一項に記載の方法を実行するための評価用キットであって、

GAPDHの試験装置上に存在するレベルに比例する信号レベルを生成するようにそれぞれ構成された複数の試験装置；および

試験装置上のGAPDHのレベルを読み取るように構成された読み取り装置；  
を含む、キット。

【請求項11】

読み取り装置が、試験装置のそれぞれからのレベルが、ADに対して陽性を示すGAPDHの基準レベルより高い場合、陽性という結果を示すように構成される、請求項10に記載のキット。

【請求項12】

読み取り装置が、ADに対する異なるリスクを示すGAPDHの基準レベルに基づいて、ADに

10

20

30

40

50

に対する異なるリスクを示すように構成される、請求項1\_0または1\_1に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病(AD)のリスク検出、診断、予後およびモニタリングのための方法に関する

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病(AD)は、最も一般的な型式の認知症である。アルツハイマー病は神経変性疾患に分類され、その原因と進行はほとんど理解されていない。病気の過程は、脳の斑やもつれに関連していると思われる。最も一般的な初期症状は、短期記憶の喪失 - 最近の出来事を思い出すことが困難となることである。

【0003】

これまでのところ、ADの標準的な診断試験がないため、診断は、AD患者によって提供された臨床情報および神経学的検査の所見に基づいて行われる。通常、ADの診断は、患者の行動および思考能力を評価するためのテストによって確認され、可能な場合は、しばしば脳スキャンが行われる。しかしながら、決定的な診断のために脳組織の検査が必要である。ADを評価する従来の方法は、非特異的であるか、または高価であり、たとえば、機能的自律の規模を調べるための機能評価アンケート(FAQ)の形式の心理テストであるミニメンタルステート検査(MMSE)(Tombaugh、The mini-mental state examination: a comprehensive review. J. Am. Geriatr. Soc. 40、922-935、1992)；脳脊髄液中のタウおよびアミロイド-<sub>1</sub>濃度の浸潤試験(Wangら、Proteomic analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease identifies GAPDH as a detergent-insoluble paired helical filament tau binding protein. FASEB J. 19、869-871、2005)；非常に高価な神経画像検査、特にコンピュータ断層撮影(CT)(Haydelら、Indications for computed tomography in patients with minor head injury. N. Engl. J. Med. 343、100-105、2000)が挙げられる。

【0004】

WO2013153461は、アルツハイマー病およびパーキンソン病のリスク検出、診断、予後およびモニタリングのための唾液中の特定のバイオマーカーによる方法を開示し、ここで、バイオマーカーは、cTnI、ミオグロビン、MMP-9、MMP-8、MMP-2、sICAM-1、ミエロペルオキシダーゼ[MPO]、IL-4、および/またはIL-5；B-型ナトリウム利尿ペプチド[BNP]、IL-1a、IL-11、IL-10、TNF-a、IFN- $\gamma$ 、VEGF、インスリン、GLP-1(活性)、GLP-1(総)、TREM1、ロイコトリエンE4、AktI、A<sub>-40</sub>、A<sub>-42</sub>、Fasリガンド、PSA、G-CSF、MIP-1a、IL-22、IL-8、IL-21、IL-15、IL-6、IL-7、GM-CSF、IL-2、IL-12、IL-17a、IL-1 $\beta$ 、MCP、IL-32またはRANTES、アポリポタンパク質AI、DおよびE、虚血修飾アルブミン(IMA)、フィブロネクチン、s<sub>100</sub>、アルファ-アミラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、組織因子活性、MCP-1、sVCAM-1、sCD-40、インスリン様増殖因子I(IGF-I)、およびIGF-IIの2つ以上を含む。

【0005】

米国特許第9,012,237号は、特定のバイオマーカーを測定することによって、被験者におけるアルツハイマー病の診断方法またはアルツハイマー病を発症するリスクの決定方法を開示し、ここで、バイオマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、インスリン様増殖因子-1(IGF-1)、腫瘍増殖因子-1(TGF- $\beta$ -1)、血管内皮増殖因子(VEGF)、インターロイキン18(IL-18)、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)から選ばれる少なくとも4つのバイオマーカーであり、IL-18および/またはMCP-1の増加、および/またはBDNF、IGF-1、VEGFおよび/またはTGF- $\beta$ -1の減少は、ADの発症の存在またはリスクを示す指標となる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

10

20

30

40

50

ADの診断およびADリスクの決定のためのはるかに容易な方法を開発することが依然として望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概略

予期せぬことに、本発明において、AD患者由来のサンプル中のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルが、アルツハイマー病の診断またはリスク検出のための単一のバイオマーカーとして役立ち得ることが、見出されている。

【0008】

したがって、1つの態様において、本発明は、以下のステップを含む、被験者におけるアルツハイマー病(AD)の診断またはADリスクの検出のための方法を提供する：

(1)ADを有さないコントロールグループならびにアルツハイマー病の異なるステージおよびタイプを有する被験者を有するADグループを含む被験者のベースラインセットからサンプルを採取するステップ；

(2)ベースラインサンプル中の単一のバイオマーカーとして、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のベースラインセットのベースラインレベルを測定するステップ；

(3)試験セット中のGAPDHのベースラインレベルに基づいて試験セット中のGAPDHについてのAD基準レベルを決定するステップ；

(4)GAPDHのレベルについてテストサンプルを測定するステップ；および

(5)試験サンプル中のGAPDHのレベルが、ステップ(3)で決定されたAD基準レベルよりも高い場合、試験サンプルがADに対して陽性であるか、またはリスクを有することを決定するステップ。

【0009】

本発明の1つの実施態様において、サンプルは、血液、尿または唾液サンプルである。特定の実施態様において、サンプルは、血漿サンプルである。

【0010】

本発明の1つの実施態様において、GAPDHについてのAD基準レベルは、約380 ng/dL～約720 ng/dLであり；ここで、被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約720 ng/dLよりも高い場合、アルツハイマー病と診断され；被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dLよりも低い場合、アルツハイマー病のリスクが低いと診断され；および被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dL～約720 ng/dLである場合、アルツハイマー病のリスクが高いと診断される。

【0011】

本発明において、GAPDHのレベルは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットによって決定される。

【0012】

別の態様において、本発明は、以下のステップを含む、それを必要とする被験者におけるアルツハイマー病(AD)に対する陽性またはリスクを試験するための方法を提供する：

(1)被験者からの血漿サンプル中のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルを測定するステップ；および

(2)被験者からのサンプル中のGAPDHのレベルを、約380 ng/dLおよび約720 ng/dLの1つ以上のGAPDHのAD基準レベルと比較するステップ；および

(3)サンプル中のGAPDHのレベルが、GAPDHのAD基準レベルよりも高い場合、サンプルが、アルツハイマー病(AD)に対して陽性であるか、またはリスクを有すると決定するステップ。

【0013】

本発明の1つの実施態様では、サンプルは、血漿サンプルである。

【0014】

本発明の特定の1つの実施態様において、GAPDHについてのAD基準レベルは、約380 ng/dL～約720 ng/dLであり；ここで、被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約720

10

20

30

40

50

ng/dLより高い場合、アルツハイマー病と診断され；被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dLより低い場合、アルツハイマー病のリスクが低いと診断され；および被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dL～約720 ng/dLである場合、アルツハイマー病のリスクが高いと診断される。

#### 【0015】

1つのさらなる実施態様において、本発明は、  
GAPDHの試験装置上に存在するレベルに比例する信号レベルを生成するようにそれぞれ構成された複数の試験装置；および  
試験装置上のGAPDHのレベルを読み取るように構成された読み取り装置；  
を含む、アルツハイマー病(AD)に対する陽性またはリスクを試験するための本発明方法を実行するための試験キットを提供する。 10

#### 【0016】

本開示の新規な概念の趣旨および範囲から逸脱することなく、その中の変形および変更が可能であるが、これらの態様および他の態様は、以下の図面とともに、好ましい実施態様の以下の説明から明らかになるであろう。

#### 【0017】

本発明の上記の概要、ならびに以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことにより、よりよく理解されるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0018】

20

【図1】コントロールおよびAD被験者の血漿サンプル中のGAPDHのレベルを示す；ここで、データは、上位四分位から下位四分位の箱として提示された；中央値は、箱内で平行に描かれる；ひげは、箱の側面の途中から、最小値と最大値へ伸びる；同じ箱内の異なる文字は有意差を示す( $P < 0.05$ )。

【図2A】ADの関連基準が、 $> 378.74$  ng/dLであることを示し、指定診断番号0および1はそれぞれ、ADを有さないコントロールおよびAD患者を示す。

【図2B】ROC曲線下面積(AUC)が $0.944 \pm 0.0219$ であり、高い精度を示していることを表す；95%信頼区間(CI)の $0.877$ - $0.981$ およびz統計値の $20.271$ ( $P < 0.0001$ )は、感度86.4%および特異度90.6%に達することができる。

【図3】Y軸として特異度(%)の統計データ、およびX軸として血漿サンプル(ADD)中のGAPDHのレベルに従ってプロットされたROC曲線を提供する。 30

#### 【図4】図3にて与えられたROC曲線から得られた回帰直線を提供する。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0019】

##### 発明の記載

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

#### 【0020】

本明細書で使用される、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上他に明確に指示されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、たとえば、「サンプル(a sample)」への言及は、複数のそのようなサンプルおよび当業者に知られているその等価物を包含する。

#### 【0021】

本発明は、それを必要とする被験者からのサンプル中のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルを決定することによるアルツハイマー病(AD)の診断方法を提供する。

#### 【0022】

本明細書で使用される「診断」または「診断する」という用語は、本発明において、被験者が疾患、すなわちアルツハイマー病に罹患しているか否かを評価することを示す。当業者には理解されるように、そのような評価は、調査される被験者の100%にとって正し 50

いとは言えないが、そうであることが好ましい。しかしながら、この用語は、被験者の統計学的に有意な部分が正確に評価され、したがって診断されることを必要とする。この用語には、アルツハイマー病またはその症状の個々の診断、ならびに被験者の連続的なモニタリングが含まれる。モニタリング、すなわち、さまざまな時点または年齢で、アルツハイマー病もしくはそれに付随する症状を有するかまたは有さない被験者を診断することは、アルツハイマー病に罹患していることが分かっている被験体のモニタリングおよびアルツハイマー病を発症する危険性があることが分かっている被験体のモニタリングを包含する。さらに、モニタリングを用いて、被験者が、成功裏に治療されるかどうか、あるいは、アルツハイマー病の少なくとも1つの症状が、ある治療によって時間とともに改善されるかどうかを決定することもできる。

10

#### 【0023】

AD海馬のニトロ化の標的としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)が同定され、GAPDHの酸化機能障害は、AD脳における神経機能および神経変性の喪失に有意に寄与することができる。(Sultanaら、Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol. Dis.* 22、76-87、2006.) GAPDHが、神経変性に重要な役割を果たしていることも報告された(Petrakら、*Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. Proteomics* 8、1744-1749、2008; Piechaczykら、Unusual abundance of vertebrate 3-phosphate dehydrogenase pseudogenes. *Nature* 312、469-471、1984)。しかしながら、これまで、GAPDHのレベルを測定することによるADの診断法は存在しなかった。

20

#### 【0024】

本発明において、被験者からのサンプル中のGAPDHのレベルは、GAPDHを測定するための任意の公知のまたは従来の方法/キットによって決定されうる。本発明の1つの実施態様では、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットなど、GAPDHに特異的に結合する抗体を使用するキットを使用することができる。本発明の1つの実施態様では、たとえば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットなど、GAPDHに特異的に結合する抗体を使用するキットを使用することができる。

#### 【0025】

本明細書で使用される「バイオマーカー」という用語は、本明細書で言及される疾患または効果の指標として働く分子種を示す。前記分子種は、被験者のサンプルに見出されるヌクレオチド配列、アミノ酸配列、DNA、タンパク質、または代謝産物であり得るが、これらに限定されるものではない。

30

#### 【0026】

本明細書で使用される「被験者」または「それを必要とする被験者」という用語は、アルツハイマー病の有無にかかわらず、任意の年齢の男性または女性の哺乳類、好ましくはヒトを意味する。

#### 【0027】

用語「抗体」は、完全抗体、それらの結合特異性を依然として保持するその誘導体またはその機能的断片を示す。特に、GAPDHに特異的に結合する本発明の抗体。

40

#### 【0028】

本明細書で使用される用語「サンプル」は、たとえば、血液、尿、唾液および組織流体サンプルなどの調査される被験者から得られたサンプルを示す。

#### 【0029】

本発明によれば、アルツハイマー病(AD)の診断または被験者におけるADリスクの検出のための方法は、以下のステップを含む：

(1)被験者のベースラインセットからのサンプルを採取するステップであって、被験者のベースラインセットが、ADを有さない被験者からなるコントロールグループおよびアルツハイマー病の異なる段階およびタイプを有する被験者からなるADグループを含むステップ；

50

(2)ベースラインサンプル中のシングルバイオマーカーとして、グリセロアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)のベースラインセットのベースラインレベルを測定するステップ；

(3)試験セットにおけるGAPDHのベースラインレベルに基づいて、試験セット中のGAPDHについての1つ以上のAD基準レベルを決定するステップ；

(4)GAPDHのレベルについて、試験サンプルを測定するステップ；および

(5)試験サンプル中のGAPDHのレベルが、ステップ(3)で決定されたAD基準レベルよりも高い場合、試験サンプルが、ADに対して陽性であるか、またはのリスクを有すると決定するステップ。

#### 【0030】

本発明によれば、サンプルは、血液、尿、唾液または任意の生理学的サンプルであってもよい。1つの特定の実施態様では、サンプルは血液サンプル、特に血漿サンプルである。

#### 【0031】

一方、本発明は、それを必要とする被験者における、アルツハイマー病(AD)に対する陽性またはリスクを試験するための方法であって、以下のステップ：

(1)被験者からのサンプル中のグリセラルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルを測定するステップ；および

(2)被験者からのサンプル中のGAPDHのレベルを、GAPDHについての1つ以上のAD基準レベルと比較すること；および

(3)サンプル中のGAPDHのレベルが、GAPDHについてのAD基準レベルよりも高い場合、サンプルが、ADに対して陽性であるか、またはリスクを有すると決定するステップ；を含む方法を提供する。

#### 【0032】

本発明において、GAPDHのレベルは、GAPDHに特異的に結合する抗体を用いるキットによって決定されうる。以下の実施例に示すように、GAPDHのレベルは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットによって決定され、GAPDHについてのAD基準レベルは、すべての被験者からのサンプルの特異度データ(%)およびGAPDHレベルの統計データに従って、特に、特に特異度データおよびGAPDHレベルの回帰分析によって、決定される。

#### 【0033】

実施例に示すように、GAPDHについてのAD基準レベルは、約380 ng/dL～約720 ng/dLであり；ここで、被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約720 ng/dLより高い場合、アルツハイマー病と診断され；被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dLより低い場合、アルツハイマー病のリスクが低いと診断され；および被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dL～約720 ng/dLである場合、アルツハイマー病のリスクが高いと診断される。この実施例では、GAPDHのレベルが、アルツハイマー病の診断またはリスク検出のための単一バイオマーカーとして使用されうることが確認されている。

#### 【0034】

本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、これらの実施例は限定ではなく例示を目的として提供される。

#### 【実施例】

#### 【0035】

##### 1. 材料および方法

###### 1. 被験者

合計43人のAD患者(60-69歳(n = 5、男性3、女性2)、70-79歳(n = 18、男性-9、女性9)および80-89歳(n = 20、男性10、女性10))、ならびに合計37人の高齢者コントロール(70-79歳(n = 20、男性11、女性9)および80-89歳(n = 17、男性13、女性4))は、台北退役軍人総合病院のメモリクリニック(TVGH)の外来から採用された。臨床面接、身体検査、検査所見および画像検査(CTおよび/またはMRI)の結果に基づくAD患者の診断決定は、臨床コンセンサ

10

20

30

40

50

ス会議で行われた。AD診断は、National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association(NINC DS-ADRDA)の基準に従って行われた(Froese、Cube law、condition factor and weight-length relationships: history、meta analysis and recommendations. J. Appl. Ichthyol. 22、241-253、2006)。全てのAD患者は、診断検査として神経学的検査、実験室試験および神経画像評価を受けた。高齢者コントロールは、外来診療所から採用された認知症愁訴のないボランティアであった。また、20-29歳の青年16名( $n = 16$ 、男性8、女性8)は、国立イラン大学のキャンパスからのボランティアであった。

#### 【 0 0 3 6 】

##### 2. サンプル

10

ヒト血漿サンプルをEDTA-2Na入りプラスチックシリンジで採取し、次いで、4 、3000r pm、および30分間にて遠心分離してタンパク質上清を得た。血漿タンパク質を液体窒素中に滴下し、次いで、以下の分析のために-80 で凍結した。酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を使用して、血漿中の特異的タンパク質レベルを定量した。市販の試薬は、ヒトGAPDH ELISAキット(DuoSet IC(登録商標)DYC5718、R&D Systems、USA)から入手した。キットを使用するためのプロトコルは、その指示書にしたがった。サンプルを、450nmの波長で、ELISAリーダー(SpectraMax(登録商標)M2マイクロプレート・リーダー、Molecular Devices Inc.、カリフォルニア、USA)によって分析した。

#### 【 0 0 3 7 】

##### 3. GAPDHレベルアッセイ

20

ELISA定量からの血漿GAPDHレベルを、ノンパラメトリックKruskal-Wallis試験(GraphPad Prism(登録商標)バージョン5.01(著作権)1992-2007 GraphPad Software Inc.)に付した。データを、下位四分位から上位四分位にボックスとして表示した。中央値は、箱内で平行に描かれる。ひげは、箱の側面の途中から、最小値と最大値へ伸びる。次に、我々は、血漿GAPDHからの高ADリスクおよび血漿Cyt C1からの自然老化の関連基準をそれぞれ特定するために、ROC曲線統計法(MedCalc(登録商標)バージョン13.3.1.0、(著作権)1993-2014 MedCalc Software bvba)を使用する。ROC曲線下面積(AUC)は、おそらく1.0 ~ 0.5の間に位置する。AUCは、0.5 ~ 0.7で低い精度、0.7 ~ 0.9である程度の精度、および0.9以上で高い精度を表す。AUC = 0.5である場合、その診断方法が完全に無効であり、診断値がないことを示す。AUC < 0.5は、実際の状況に適合せず、実際にはほとんど発生しない。

30

#### 【 0 0 3 8 】

##### 統計分析

2つのグループ間の比較を、スチュードントのt検定によって分析した。3つのグループ内の比較を、ANOVA試験によって分析した。患者の生存曲線の比較を、ログランク試験によって分析した。インビボの腫瘍生存度の比較を、フィッシャーの正確な試験によって分析した。P < 0.05の値は、統計的に有意であると考えられた。

#### 【 0 0 3 9 】

##### II. 結果

20-29歳( $n = 16$ 、男性8、女性8)の青年コントロールおよび70-79歳( $n = 20$ 、男性11、女性9)および80-89歳( $n = 17$ 、男性13、女性4)の高齢者コントロールおよび60-69歳( $n = 5$ 、男性3、女性2)、70-79歳( $n = 18$ 、男性9、女性9)および80-89歳( $n = 20$ 、男性10、女性10)のAD患者からヒト血漿サンプルを採取した。データを、GraphPadプリズムパックモジュールを使用するノンパラメトリックKruskal-Wallis試験に付した。

40

#### 【 0 0 4 0 】

コンロールグループの血漿GADPHは、年齢および性別にかかわらず、AD患者のものよりもすべて有意に低かった(P < 0.05)(箱ひげ図に基づく図1を参照)。収集されたすべてのデータを表1に示す。

#### 【 0 0 4 1 】

表1に示されるように、>718ng/dLである血漿GAPDHの基準は、ADに対して100%の特異度を示した。血漿GAPDHのレベルが0 ~ 378 ng/dLの範囲にある場合、それはAD状態のリス

50

クが低いことを示した。ADへの関連基準の境界線は、378 ng/dLの血漿GAPDHレベルであることが判明した。さらに、AD状態(>90%の特異度)のリスクが高い基準は、血漿GAPDHのレベルが378.7~718 ng/dLであると判定された。血漿GAPDHレベルが高く、718 ng/dLである場合、特定のADについて100%確信性のある診断が決定された。ROCの統計的分析の後、この方法がADの状態を評価するために非常に正確であることが証明されている。

#### 【0042】

表1：血漿GAPDHレベルとADリスクとの相関関係

#### 【表1】

基準	感度	95% CI	特異度	95% CI	ADリスク	10
≥0	100.00	91.8 ~ 100.0	0.00	0.0 ~ 6.7	低	
>70.472	100.00	91.8 ~ 100.0	45.28	31.6 ~ 59.6	低	
>103.6066	97.67	87.7 ~ 99.9	45.28	31.6 ~ 59.6	低	
>144.2486	97.67	87.7 ~ 99.9	52.83	38.6 ~ 66.7	低	
>147.0755	95.35	84.2 ~ 99.4	52.83	38.6 ~ 66.7	低	
>251.6232	95.35	84.2 ~ 99.4	75.47	61.7 ~ 86.2	低	
>273.3577	93.02	80.9 ~ 98.5	75.47	61.7 ~ 86.2	低	
>316.1778	93.02	80.9 ~ 98.5	83.02	70.2 ~ 91.9	低	20
>337.0781	88.37	74.9 ~ 96.1	83.02	70.2 ~ 91.9	低	
>338.1439	88.37	74.9 ~ 96.1	84.91	72.4 ~ 93.3	低	
>347.4587	86.05	72.1 ~ 94.7	84.91	72.4 ~ 93.3	低	
>378.7396	86.05	72.1 ~ 94.7	90.57	79.3 ~ 96.9	高	
>390.8812	83.72	69.3 ~ 93.2	90.57	79.3 ~ 96.9	高	
>446.6771	83.72	69.3 ~ 93.2	92.45	81.8 ~ 97.9	高	
>498.8583	74.42	58.8 ~ 86.5	92.45	81.8 ~ 97.9	高	
>521.3342	74.42	58.8 ~ 86.5	94.34	84.3 ~ 98.8	高	
>551.1322	69.77	53.9 ~ 82.8	94.34	84.3 ~ 98.8	高	
>579.6789	69.77	53.9 ~ 82.8	96.23	87.0 ~ 99.5	高	
>592.284	65.12	49.1 ~ 79.0	96.23	87.0 ~ 99.5	高	30
>594.6474	65.12	49.1 ~ 79.0	98.11	89.9 ~ 100.0	高	
>702.3464	55.81	39.9 ~ 70.9	98.11	89.9 ~ 100.0	高	
>717.9637	55.81	39.9 ~ 70.9	100.00	93.3 ~ 100.0	有り	
>1126.84	0.00	0.0 ~ 8.2	100.00	93.3 ~ 100.0	有り	

40

#### 【0043】

ROC曲線の統計的分析に基づいて、ADについての血漿GAPDHの関連基準は、図2(A)に示すように、378.74 ng/dLを超えた。指定された診断番号0および1は、それぞれ、ADのないコントロールグループおよびAD患者を示した。ROC曲線下面積(AUC)は、 $0.944 \pm 0.0219$ であり、高精度、0.877-0.981の95%信頼区間(CI)および20.271のz統計値( $P < 0.0001$ )を示し、図2(B)に示すように、約86.4%の感度および90.6%の特異度であった。

#### 【0044】

さらに、Y軸としての特異度(%)の統計データ、およびX軸としての血漿サンプル中のGAPDHレベルに基づいて、受信者動作特性曲線(ROC曲線)を得た。ROC曲線を図3にプロットした。図3に示されたROC曲線の直線部分から、回帰直線 $y = 0.1554x + 31.879$ が得られた(図50

4参照)が、これは、5段階のADリスク指標によって分割される。5段階のADリスク指標の意味を表2に示す。

【0045】

表2：本発明方法による5段階の意味

【表2】

ADリスク指標	意味
>5	アルツハイマー病と判定するための強い証拠
4~5	アルツハイマー病と判定するための中程度の証拠
3~4	アルツハイマー病と判定するための弱い証拠
2~3	アルツハイマー病を除外するための弱い証拠
1~2	アルツハイマー病を除外するための中程度の証拠
<1	アルツハイマー病を除外するための強い証拠

10

【0046】

本発明が属する技術分野における当業者は、本発明を、本明細書の記載に基づくより広い範囲まで、より詳しい説明を必要とせずに利用することができると考えられる。したがって、提供される説明および特許請求の範囲は、本発明の範囲を制限するものではなく、例示的な目的であると理解されるべきである。

20

【図1】

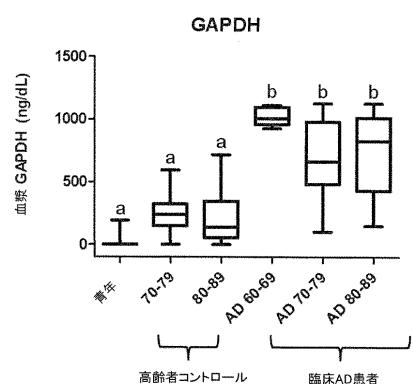


Figure 1

【図2 A】

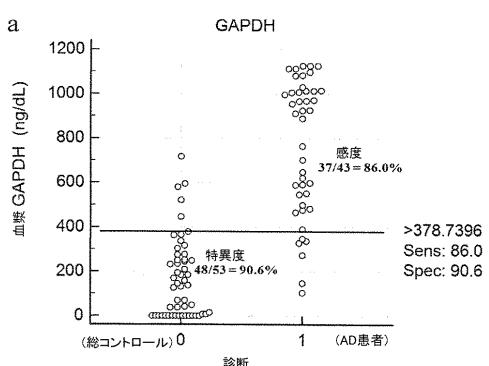


Figure 2(A)

【図2B】

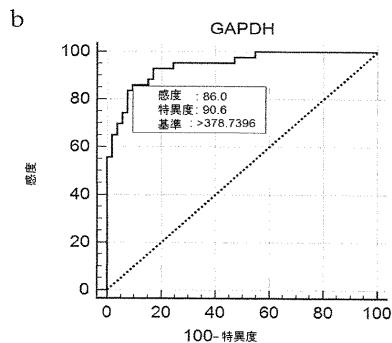


Figure 2(B)

【図4】

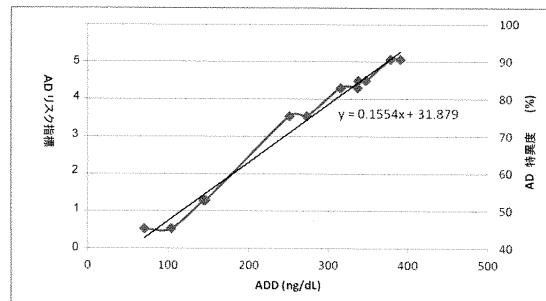


Figure 4

【図3】

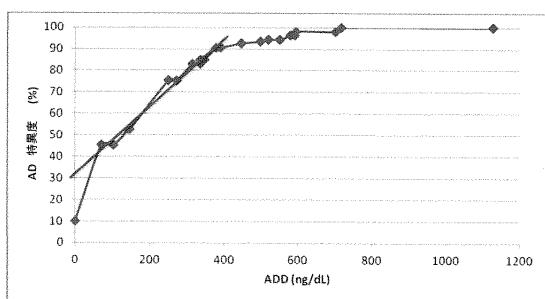


Figure 3

---

フロントページの続き

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 リン・チャイ-チン

台湾266イーラン・カウンティ、サンシン・タウンシップ、ダブー・フィフス・ロード、ナンバ-175

(72)発明者 ツァイ・チェン-ウェイ

台湾116タイペイ・シティ、ウェンシャン・ディストリクト、ムージヤー・ロード、セクション2、レイン109、ナンバー135、2フロア

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特表2008-506415 (JP, A)

特開2005-132738 (JP, A)

米国特許出願公開第2002/0172676 (US, A1)

米国特許出願公開第2009/0048121 (US, A1)

米国特許出願公開第2003/0092085 (US, A1)

KADMIRI, NE et al., A proteomic approach for the involvement of the GAPDH in Alzheimer disease in the blood of Moroccan FAD cases, J Mol Neurosci., 2014年 7月15日, 54, 774-779

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 33/48 - 33/98

C 12 N 9/04

C 12 M 1/68

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)