(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
2020年10月29日(29.10.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/217865 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01)　*C12Q 1/68* (2018.01)
C12N 15/12 (2006.01)　*G01N 33/15* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)　*G01N 33/50* (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2020/014433

(22) 国際出願日：　2020年3月30日(30.03.2020)

(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 2019-086092　2019年4月26日(26.04.2019)　JP

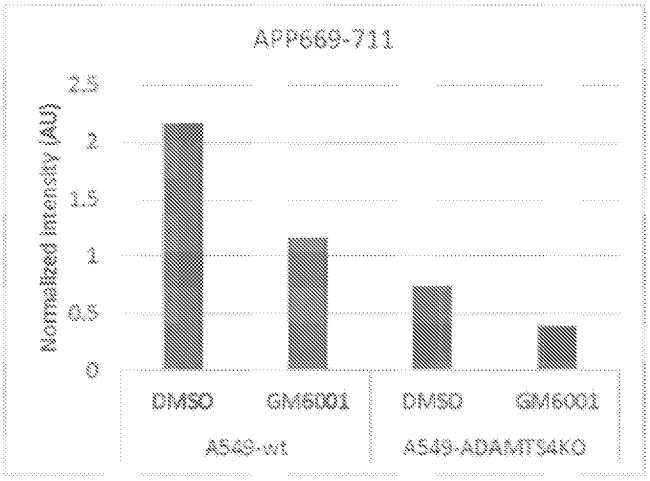
(71) 出願人: 株式会社島津製作所 (**SHIMADZU CORPORATION**) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地 Kyoto (JP). 国立大学法人東京大学(**THE UNIVERSITY OF TOKYO**) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 金子 直樹(**KANEKO, Naoki**); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 富田 泰輔(**TOMITA, Taisuke**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 吉澤 遥太(**YOSHIZAWA, Yota**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 松崎 将也(**MATSUZAKI, Masaya**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 横山 雅

(54) **Title:** SCREENING METHOD FOR ADAMTS4 APP CLEAVING ACTIVITY REGULATORY SUBSTANCES

(54) 発明の名称： ＡＤＡＭＴＳ４のＡＰＰ切断活性制御物質のスクリーニング方法

[図3]



(57) **Abstract:** A method for screening regulatory substances of APP 669 N-terminus cleaving activity, wherein the screening method includes a step for causing a candidate substance to act on cultured cells, a step for measuring the Aβ-related peptide produced from the cultured cells, and a step for evaluating the APP 669 N-terminus cleaving activity. The candidate substance is selected, for example, from a group consisting of low-molecular compounds, peptides, proteins, and nucleic acids. An APP 669 N-terminus cleaving enzyme including ADAMTS4.

(57) 要約：ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質をスクリーニングする方法であって、候補物質を培養細胞に作用させる工程と、前記培養細胞から産生されるＡβ関連ペプチドを測定する工程と、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程とを含む、スクリーニング方法。前記候補物質が、例えば、低分子化合物、ペプチド、タンパク質及び核酸からなる群から選ばれる。ＡＤＡＭＴＳ４を含むＡＰＰ６６９のＮ末端切断酵素。

WO 2020/217865 A1

［続葉有］

シャラ(**YOKOYAMA, Miyabishara**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人:特許業務法人深見特許事務所(**FUKAMI PATENT OFFICE, P.C.**); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目２番４号 中之島フェスティバルタワー・ウエスト Osaka (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ：

ＡＤＡＭＴＳ４のＡＰＰ切断活性制御物質のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、ＡＤＡＭＴＳ４のＡＰＰ切断活性制御物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] アルツハイマー病（Alzheimer's disease；ＡＤ）は認知症の主な原因で、認知症全体の半数以上を占める神経変性疾患である。認知症患者数は２０１７年で世界中に約５０００万人いると推計され、２０３０年には約８２００万人になると見込まれている。日本国内でも認知症患者数は２０２５年には７００万人に達すると推定されている。

[0003] アルツハイマー病の発症にはアミロイドβ（Ａβ）が深く関わっていると考えられている。膜一回貫通タンパク質で７７０残基のアミノ酸から成るアミロイド前駆タンパク質（Amyloid precursor protein；ＡＰＰ）が各種プロテアーゼによる切断を受けることによって、様々な分子種のＡβが産生される（図１参照）。主要なＡβとしてはアミノ酸４０残基のＡβ１－４０とアミノ酸４２残基のＡβ１－４２が存在し、Ａβ１－４２は凝集性が強い。アルツハイマー病では、Ａβの線維化を伴う凝集により脳内に老人斑が出現し、それが最も早期の病理学的変化と考えられている。

[0004] Ａβ１－４０及びＡβ１－４２は、ＡＰＰから、Ｎ末端を切断するβ－セクレターゼによる切断、及びＣ末端を切断するγ－セクレターゼによる切断によって生成される。また、Ａβの１７位のロイシンのＮ末端を切断するα－セクレターゼも存在することが知られており、α－セクレターゼはｓＡＰＰαの産生に関与している。

[0005] Ａβ１－４０及びＡβ１－４２以外にもＡＰＰからは様々なＡβ分子種（すなわち、Ａβ関連ペプチド）が産生されることが報告されており、ヒト血

漿中にも複数種類のＡβ関連ペプチドが存在することが示されている（非特許文献１，２，３）。

[0006] それらＡβ関連ペプチドの中で、ＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０）とも呼ばれる）は、脳内アミロイド蓄積状態を推定する血液バイオマーカーの構成因子として有効であることが報告された（非特許文献４，５）。ＡＰＰ６６９－７１１のＣ末端は、Ａβ１－４０のＣ末端と同じであるため、γ－セクレターゼによる切断を受けた部位と考えられるが、ＡＰＰ６６９－７１１のＮ末端がどのようなプロテアーゼにより切断されたのかは明らかとなっていない。

[0007] α－セクレターゼがＡＰＰを切断することによりｓＡＰＰαが産生されると、Ａβ（すなわち、Ａβ１－４０及びＡβ１－４２）の産生量が減少することが確認されている。その機構を利用し、α－セクレターゼ活性を調節することで脳内のアミロイド蓄積を抑制し、神経変性疾患の治療に役立てるというアプローチが報告されている（非特許文献６）。

[0008] 一方、脳の機能に重要な分泌タンパク質であるリーリンの発現低下や分解亢進がアルツハイマー病等の疾患の一因となることが知られており、リーリンの分解酵素A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3（ＡＤＡＭＴＳ－３）を同定し、その活性制御に基づいたアルツハイマー病等の疾患の有効な予防や治療手段の開発につなげるアプローチも報告されている（ＷＯ　２０１４／０２７６６８，日本国特許第５８３８４８１号）。

[0009] ＷＯ　２０１５／１１１４３０（米国公開ＵＳ　２０１６／０３３４４２０）には、ＡＰＰ切断型ペプチドの測定方法が開示されている。

[0010] 特開２０１７－２０９８０号公報（米国公開ＵＳ　２０１７／００１６９１０）には、ポリペプチドの質量分析方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：ＷＯ　２０１４／０２７６６８

特許文献2：日本国特許第５８３８４８１号公報

特許文献3：ＷＯ　２０１５／１１１４３０

特許文献4：米国公開ＵＳ　２０１６／０３３４４２０

特許文献5：特開２０１７－２０９８０号公報

特許文献6：米国公開ＵＳ　２０１７／００１６９１０

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Wang R, Sweeney D, Gandy SE, Sisodia SS: The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. J Biol Chem. 1996; 13;271(50):31894-902.

非特許文献2：Beyer I, Rezaei-Ghaleh N, Klafki HW, Jahn O, Hausmann U, Wiltfang J, Zweckstetter M, Knolker HJ: Solid-Phase Synthesis and Characterization of N-Terminally Elongated Aβ-3-x -Peptides. Chemistry. 2016;13;22(25):8685-93.

非特許文献3：Kaneko N, Yamamoto R, Sato TA, Tanaka K.：Identification and quantification of amyloid beta-related peptides in human plasma using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2014;90(3):104-17.

非特許文献4：Kaneko N, Nakamura A, Washimi Y, Kato T, Sakurai T, Arahata Y, Bundo M, Takeda A, Niida S, Ito K, Toba K, Tanaka K, Yanagisawa K. : Novel plasma biomarker surrogating cerebral amyloid deposition. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2014;90(9):353-64.

非特許文献5：Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Dore V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K, Tanaka K, Masters CL, Yanagisawa K. : High performance plasma amyloid-β biomarkers for Alzheimer's disease. Nature. 2018;8;554(7691):249-254.

非特許文献6：Peron R, Vatanabe IP, Manzine PR, Camins A, Cominetti MR

. : Alpha-Secretase ADAM10 Regulation: Insights into Alzheimer's Disease Treatment. Pharmaceuticals 2018; 11(1), 12

非特許文献7：Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhiro S, Capell A, Walter J, Grunberg J, Haass C, Iwatsubo T, Obata K. : The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(5):2025-30.

非特許文献8：Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zeng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, Iwatsubo T. : Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. Neuron. 2012;76(2):410-22.

非特許文献9：White AR, Du T, Laughton KM, Volitakis I, Sharples RA, Xilinas ME, Hoke DE, Holsinger RM, Evin G, Cherny RA, Hill AF, Barnham KJ, Li QX, Bush AI, Masters CL. : Degradation of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide by metal-dependent up-regulation of metalloprotease activity. J Biol Chem. 2006;281(26):17670-80.

非特許文献10：Lichtenthaler SF, Multhaup G, Masters CL, Beyreuther K. : A novel substrate for analyzing Alzheimer's disease gamma-secretase. FEBS Lett. 1999;453(3):288-92.

非特許文献11：Kanatsu K, Morohashi Y, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T, Iwatsubo T. : Decreased CALM expression reduces Aβ42 to total Aβ ratio through clathrin-mediated endocytosis of γ-secretase. Nat Commun. 2014;5:3386.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] αーセクレターゼについての上述した知見を踏まえれば、ＡＰＰ６６９の

Ｎ末端を切断する酵素（以下、本明細書において単にＡＰＰ６６９切断酵素と呼ぶこともある）の活性を制御することが、Ａβ（すなわち、Ａβ１－４０及びＡβ１－４２）の産生抑制に基づくアルツハイマー病の予防や治療手段として重要となると考えられる。このような技術的課題はこれまで知られていない。

[0014] 現時点でＡＰＰ６６９－ｘ産生に関わるＡＰＰ６６９のＮ末端切断酵素が明らかとなっていないため、まず、そのような酵素を同定することが求められる。

[0015] そして、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を強く制御する（強く促進する）物質が見つかれば、Ａβ（Ａβ１－４０及びＡβ１－４２）の産生量の抑制にも利用できると考えられる。つまり、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断酵素活性の制御物質が薬剤候補になる可能性があり、それを開発するためには、制御物質をスクリーニングする方法が必要となってくる。

[0016] そこで、本発明の目的は、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断酵素を同定することにある。また、本発明の目的は、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を制御する物質をスクリーニングする方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者らは、鋭意検討した結果、A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4（ＡＤＡＭＴＳ４）がＡＰＰ６６９のＮ末端を切断する酵素の一つであることを突き止めた。さらには、ＡＰＰ６６９－ｘ（Ｎ末端がＡＰＰ６６９であるペプチド）の産生を抑制するとＡβ（Ａβ１－４０及びＡβ１－４２）が増えること、Ｎ末端がＡＰＰ６６９のＡＰＰ断片はβ－セクレターゼ（ＢＡＣＥ１）による切断を受けないことも確認した。これらの知見から、本発明に到達した。

[0018] 本発明の第１の態様は、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質をスクリーニングする方法であって、

候補物質を培養細胞に作用させる工程と、

前記培養細胞から産生されるＡβ関連ペプチドを測定する工程と、

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程と、

を含む、スクリーニング方法である。

[0019] 本発明の第２の態様は、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質をスクリーニングする方法であって、

In vitroの系で、候補物質存在下のもとＡＤＡＭＴＳ４を全長ＡＰＰ又はＡＰＰ６６９位前後の配列を含むＡＰＰ断片に作用させる工程と、

前記全長ＡＰＰ又はＡＰＰ６６９位前後の配列を含むＡＰＰ断片から産生されるＡＰＰ６６９－ｘを測定する工程と、

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程と、

を含む、スクリーニング方法である。

[0020] 本発明の第３の態様は、ＡＤＡＭＴＳ４を含むＡＰＰ６６９のＮ末端切断剤である。

発明の効果

[0021] 本発明は、ＡＤＡＭＴＳ４が、アミロイド前駆体タンパク質（Amyloid precursor protein;ＡＰＰ）の６６９番目のアミノ酸のＮ末端部位を切断してＡＰＰ６６９－ｘペプチドを産生するという新規な知見に基づいており、ＡＤＡＭＴＳ４を含むＡＰＰ６６９のＮ末端切断剤が提供される。

[0022] 本発明によれば、ＡＰＰ６６９－ｘペプチド量を指標として、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を制御する物質をスクリーニングする方法が提供される。

[0023] 本発明によれば、ＡＰＰ６６９－ｘペプチド量を指標として、ＡＤＡＭＴＳ４によるＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を制御する物質をスクリーニングする方法が提供される。

[0024] 本発明のスクリーニング方法によれば、ＡＰＰ６６９－ｘペプチドの産生量の変化に応じて、同じＡＰＰから産生されるアミロイドβ（Ａβ）の量も変動するため、ＡＤＡＭＴＳ４に着目した分子標的薬や遺伝子治療に有効な物質のスクリーニングに有用な手法となる。

[0025] アルツハイマー病の発症にはアミロイドβ（Ａβ）が深く関わっていると

考えられており、そのため、本発明のスクリーニング方法によれば、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を制御することに基づいて、アルツハイマー病の予防薬や治療薬開発に有用なスクリーニングが可能となる。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]図１は、アミロイド前駆タンパク質（ＡＰＰ）の分解による、Ａβペプチドの生成経路を模式的に示す図である。

[図2]図２は、Ａ５４９－ＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞において、改変されたＡＤＡＭＴＳ４遺伝子領域の配列を示す。上段は、元ゲノムについての塩基配列（配列番号１２）を示しており、下段は、遺伝子編集後のゲノム（３アレル）についての塩基配列：上から、１６ｂｐ欠損した配列（配列番号１３）、２９ｂｐ欠損した配列（配列番号１４）、２０ｂｐ欠損した配列（配列番号１５）を示している。

[図3]図３は、実施例１において、Ａ５４９－ＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞とＡ５４９－ｗｔ細胞それぞれに、ＧＭ６００１（２５μＭ）、又は、コントロールとしてＤＭＳＯを添加したときの培養上清中のＡＰＰ６６９－７１１産生量を表すグラフであり、縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。

[図4]図４は、実施例１において、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフである。

[図5]図５は、実施例１において、Ａβ１－４０産生量に関するグラフである。

[図6]図６は、実施例１において、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[図7]図７は、実施例２において、ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫにＡＤＡＭＴＳ４ plasmid vectorとempty pcDNA3.1 hygro+ vectorとを１：１０および１０：１の割合でco-transfectionしたときの培養上清中のＡＰＰ６６９－７１１産生量を表すグラフであり、vectorをtransfectionしていない細胞（mock）とempty pcDNA3.1 hygro+ vectorのみをtransfectionした細胞（empty）を

コンロトールとした。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。

[図8]図８は、実施例２において、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフである。

[図9]図９は、実施例２において、Ａβ１－４０産生量に関するグラフである。

[図10]図１０は、実施例２において、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[図11]図１１は、実施例３において、ＨＥＫ細胞へヒトＡＰＰと共にＥＧＦＰ、ＡＤＡＭＴＳ４、および不活性型ＡＤＡＭＴＳ４＿Ｅ３６２Ａをco-transfectionしたときの培養上清中のＡＰＰ６６９－７１１産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。

[図12]図１２は、実施例３において、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフである。

[図13]図１３は、実施例３において、Ａβ１－４０産生量に関するグラフである。

[図14]図１４は、実施例３において、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[図15]図１５は、実施例４において、ＢＥ（２）－Ｃ細胞へ２５μＭ ＧＭ６００１、又は１０μＭ ＩＮＣＢ３６１９を作用させたときの培養上清中のＡＰＰ６６９－７１１産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。

[図16]図１６は、実施例４において、ＢＥ（２）－Ｃ細胞についてのＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフである。

[図17]図１７は、実施例４において、ＢＥ（２）－Ｃ細胞についてのＡβ１－４０産生量に関するグラフである。

[図18]図１８は、実施例４において、ＢＥ（２）－Ｃ細胞についてのＡβ１－３８産生量に関するグラフである。

[図19]図１９は、実施例４において、Ａ５４９細胞へ２５μＭ ＧＭ６００１、又は１０μＭ ＩＮＣＢ３６１９を作用させたときの培養上清中のＡＰＰ６６９－７１１産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。

[図20]図２０は、実施例４において、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフである。

[図21]図２１は、実施例４において、Ａβ１－４０産生量に関するグラフである。

[図22]図２２は、実施例４において、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[図23]図２３は、実施例４において、ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫ細胞へ２５μＭ ＧＭ６００１を作用させたときの培養上清中のＡＰＰ６６９－７１１産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。

[図24]図２４は、実施例４において、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフである。

[図25]図２５は、実施例４において、Ａβ１－４０産生量に関するグラフである。

[図26]図２６は、実施例４において、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[図27]図２７は、実施例５において、ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫ細胞に対して、ＭＴ－ＭＭＰ１，２，３，４，５，又は６のvectorをtransfectionしたときの培養上清中のＡＰＰ６６９－７１１産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。

[図28]図２８は、実施例５において、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフである。

[図29]図２９は、実施例５において、Ａβ１－４０産生量に関するグラフである。

[図30]図３０は、実施例５において、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[図31]図３１は、実施例６において、ＨＥＫ細胞に対して、Ｆｕｌｌ ｌｅｎｇｔｈ ＡＰＰ、ｃ１０２、又はｃ９９をtransfectionしたときの培養上清中のＡβ関連ペプチド（ＡＰＰ６６９－７０９、ＡＰＰ６６９－７１１、Ａβ１－３８、Ａβ１－４０）の産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。

発明を実施するための形態

[0027] ［ＡＤＡＭＴＳ４］

ＡＤＡＭＴＳ（トロンボスポンジンモチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ, A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs）ファミリーは、ＡＤＡＭのサブファミリーであり、哺乳動物等に見いだされる細胞外プロテアーゼファミリーである。ＡＤＡＭＴＳには現在１９のメンバーが存在している。ＡＤＡＭＴＳは切断する基質を中心にいくつかのサブグループに分類されており、ＡＤＡＭＴＳ１，４，５，８，９，１５，及び２０が、アグリカナーゼ／プロテオグリカナーゼ（Aggrecanase／Proteoglycanase）と呼ばれる一群とされている。

[0028] 上記のように、ＡＤＡＭＴＳ４は公知であって、ＡＤＡＭＴＳ４遺伝子配列は、ＮＰ＿００５０９０．３として登録されている。なお、ＡＤＡＭＴＳ４遺伝子には２つのＳＮＰが存在しており（ｒｓ４２３３６７、ｒｓ４１２７００４１）、コードされるタンパク質には、それぞれのアミノ酸置換（Ｑ６２６Ｒ、Ｐ７２０Ａ）を生じる。

[0029] 本発明者らは、ＡＤＡＭＴＳ４が、ＡＰＰ６６９のＮ末端を切断する酵素の一つであることを突き止めた。すなわち、ＡＤＡＭＴＳ４が、アミロイド前駆体タンパク質（Amyloid precursor protein;ＡＰＰ）の６６９番目のアミノ酸のＮ末端部位を切断してＡＰＰ６６９－ｘペプチドを産生する。ここで、全長ＡＰＰは７７０残基のアミノ酸から成るので、ｘは、６６９よりも大きい７７０までの整数を意味する。

[0030] このことにより、本発明により、ＡＤＡＭＴＳ４を含むＡＰＰ６６９のＮ末端切断剤が提供される。また、以下に説明するスクリーニング方法との関連において、in vitroの系において、ＡＤＡＭＴＳ４をＡＰＰ６６９のＮ末端切断剤として使用する方法、及び、in vitroの系における、ＡＤＡＭＴＳ４のＡＰＰ６６９のＮ末端切断剤としての使用が提供される。

[0031] ［ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質のスクリーニング方法］

本発明の実施形態において、スクリーニング方法は、

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質をスクリーニングする方法であって、

候補物質を培養細胞に作用させる工程と、

前記培養細胞から産生されるＡβ関連ペプチドを測定する工程と、

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程と、

を含む。

[0032] 前記Ａβ関連ペプチドには、種々の分子種が含まれ、それらのうち、ＡＰＰ６６９のＮ末端で切断されたペプチドとしては、ＡＰＰ６６９－ｘとして表すことができる。全長ＡＰＰは７７０残基のアミノ酸から成るので、ｘは、６６９よりも大きい７７０までの整数を意味する。

[0033] また、前記Ａβ関連ペプチドには、ＡＰＰの６６９番目よりもＮ末端側で切断されたペプチドも含まれる。候補物質によっては、ＡＰＰの種々の部位で切断されることが考えられる。

[0034] また、前記Ａβ関連ペプチドとして、限定されることなく、次のペプチドを例示することができる。ＡＰＰ６６３－７１１，ＡＰＰ６６４－７１１，ＡＰＰ６６６－７０９，ＡＰＰ６６６－７１１，ＡＰＰ６６９－７０９（配列番号３），ＡＰＰ６６９－７１０，ＡＰＰ６６９－７１１（配列番号４），ＡＰＰ６６９－７１３，ＡＰＰ６７１－７１１，ＡＰＰ６７２－７０９（配列番号１），ＡＰＰ６７２－７１１（配列番号２），ＡＰＰ６７２－７１３（配列番号５），ＡＰＰ６７４－７１１。

[0035] ＡＰＰ６７２－７０９（Ａβ１－３８）（配列番号１）：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG

ＡＰＰ６７２－７１１（Ａβ１－４０）（配列番号２）：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

ＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８））（配列番号３）：

VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG

ＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））（配列番号４）：

VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

ＡＰＰ６７２－７１３（Ａβ１－４２）（配列番号５）：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

[0036] 上記のように、ＡＰＰ６７２－７０９とＡβ１－３８とは同じペプチドを表す。同様に、ＡＰＰ６７２－７１１とＡβ１－４０とは同じペプチドを表し、ＡＰＰ６６９－７０９とＡβ（－３－３８）とは同じペプチドを表し、ＡＰＰ６６９－７１１とＡβ（－３－４０）とは同じペプチドを表し、ＡＰＰ６７２－７１３とＡβ１－４２とは同じペプチドを表す。

[0037] すなわち、前記Ａβ関連ペプチドをＡβ１－ｙという表記を行う場合には、ｙ＝ｘ－６７１となる。

[0038] ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質の候補物質を培養細胞に作用させる。この工程は、通常の培養法により行うことができる。

[0039] 次に、前記培養細胞から産生されたＡβ関連ペプチドを測定する。この測定工程は、公知の方法により、培養上清試料について行うことができる。測定対象とする前記Ａβ関連ペプチド（ＡＰＰ６６９－ｘ、及び／又は、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチド）について測定する。

[0040] 測定工程において、基本的にはＡβ関連ペプチド濃度及び／又は量を測定するが、当業者が濃度及び／又は量に準じて用いる他の単位、例えば、質量分析における検出イオン強度であってもよい。

[0041] Ａβ関連ペプチドの測定は、生体分子特異的親和性に基づく検査によって行ってもよい。生体分子特異的親和性に基づく検査は、当業者によく知られた方法であり、特に限定されないが、イムノアッセイが好ましい。具体的に

は、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）（サンドイッチイムノ法、競合法、及び直接吸着法を含む）、免疫沈降法、沈降反応、免疫拡散法、免疫凝集測定、補体結合反応分析、免疫放射定量法、蛍光イムノアッセイ、プロテインＡイムノアッセイなどの、競合及び非競合アッセイ系を含むイムノアッセイが含まれる。イムノアッセイにおいては、生体由来試料中のＡβ関連ペプチドに結合する抗体を検出する。

[0042] Ａβ関連ペプチドの測定を、アミロイド前駆タンパク質（ＡＰＰ）由来のペプチドを認識可能な抗原結合部位を持つ免疫グロブリン、またはアミロイド前駆タンパク質（ＡＰＰ）由来のペプチドを認識可能な抗原結合部位を含む免疫グロブリン断片を用いて作製された抗体固定化担体を用いて行ってもよい。前記抗体固定化担体を用いた免疫沈降法により質量分析装置での試料中ペプチドの検出を行うことができる（Immunoprecipitation-Mass Spectrometry； ＩＰ－ＭＳ）。

[0043] また、本発明において、連続的に免疫沈降（Consecutive Immunoprecipitation；ｃＩＰ）を行い、その後、質量分析装置での試料中ペプチドの検出を行ってもよい（ｃＩＰ－ＭＳ）。２回連続でアフィニティ精製を行うことにより、１回のアフィニティ精製だけでは排除しきれなかった夾雑物質を、２回目のアフィニティ精製によりさらに減少させることができる。このため、夾雑物質によるＡβ関連ペプチドのイオン化抑制を防ぐことができ、試料中の微量なＡβ関連ペプチドでも質量分析で高感度に計測することが可能となる。

[0044] 本発明においては、この場合に用いられる質量分析法は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）質量分析法、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）質量分析法などによる質量分析法であることが好ましい。例えば、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ（マトリックス支援レーザー脱離イオン化－飛行時間）型質量分析装置、ＭＡＬＤＩ－ＩＴ（マトリックス支援レーザー脱離イオン化－イオントラップ）型質量分析装置、ＭＡＬＤＩ－ＩＴ－ＴＯＦ（マト

リックス支援レーザー脱離イオン化－イオントラップ－飛行時間）型質量分析装置、ＭＡＬＤＩ－ＦＴＩＣＲ（マトリックス支援レーザー脱離イオン化－フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴）型質量分析装置、ＥＳＩ－ＱｑＱ（エレクトロスプレーイオン化－三連四重極）型質量分析装置、ＥＳＩ－Ｑｑ－ＴＯＦ（エレクトロスプレーイオン化－タンデム四重極－飛行時間）型質量分析装置、ＥＳＩ－ＦＴＩＣＲ（エレクトロスプレーイオン化－フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴）型質量分析装置等を用いることができる。

[0045] また、ＭＡＬＤＩ質量分析において、マトリックス、及びマトリックス溶媒は、当業者が適宜決定することができる。

[0046] マトリックスとしては、例えば、α－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸（ＣＨＣＡ）、２，５-ジヒドロキシ安息香酸（２，５－ＤＨＢ）、シナピン酸、３－アミノキノリン（３－ＡＱ）等を用いることができる。

[0047] マトリックス溶媒としては、例えば、アセトニトリル（ＡＣＮ）、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、メタノール、エタノール及び水からなる群から選択して用いることができる。より具体的には、ＡＣＮ－ＴＦＡ水溶液、ＡＣＮ水溶液、メタノール－ＴＦＡ水溶液、メタノール水溶液、エタノール－ＴＦＡ水溶液、エタノール溶液などを用いることができる。

[0048] ＭＡＬＤＩ質量分析において、マトリックス添加剤（コマトリックス）が併用されてもよい。マトリックス添加剤は、当業者が適宜選択することができる。例えば、マトリックス添加剤として、ホスホン酸基含有化合物を用いることができる。具体的には、ホスホン酸基を１個含む化合物として、ホスホン酸（Phosphonic acid）、メチルホスホン酸（Methylphosphonic acid）、フェニルホスホン酸（Phenylphosphonic acid）、及び1-ナフチルメチルホスホン酸（1-Naphthylmethylphosphonic acid）等が挙げられる。また、ホスホン酸基を２個以上含む化合物として、メチレンジホスホン酸（Methylenediphosphonic acid；ＭＤＰＮＡ）、エチレンジホスホン酸（Ethylenediphosphonic acid）、エタン-1-ヒドロキシ-1,1-ジホスホン酸（Ethane-1-hydroxy-1

,1-diphosphonic acid）、ニトリロトリホスホン酸（Nitrilotriphosphonic acid）、及びエチレンジアミノテトラホスホン酸（Ethylenediaminetetraphosphonic acid）等が挙げられる。上記のホスホン酸基含有化合物の中でも、１分子中に２以上、好ましくは２～４個のホスホン酸基を有する化合物が好ましい。

[0049] 測定されたＡβ関連ペプチドの産生量から、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する。この評価工程は、例えば、次のようにして行うことができる。

[0050] 前記Ａβ関連ペプチドが、ＡＰＰ６６９－ｘである場合、例えば、

前記候補物質を作用させていないコントロール細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量を基準レベルとして、

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも高い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が増加したと判断し、及び

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも低い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が低下したと判断する。

[0051] この場合において、ただ１種のＡＰＰ６６９－ｘ、例えば、ＡＰＰ６６９－７０９について評価を行ってもよい。あるいは、ＡＰＰ６６９－７０９、ＡＰＰ６６９－７１１、ＡＰＰ６６９－７１３などの複数種について評価を行ってもよい。複数種についての評価を行う場合には、ＡＰＰ６６９のＮ末端側の切断活性に着目しているのであるから、これら複数種について総合的（個々の比較、合計量としての比較）に評価することが考えられる。

[0052] 前記Ａβ関連ペプチドが、ＡＰＰ６６９－ｘ、及び、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチドである場合、例えば、

前記ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程において、

前記候補物質を作用させていないコントロール細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量及びＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチド量の各量を基準レベルとして、

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよ

りも高く、且つ、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチド量が前記基準レベルと同等もしくは前記基準レベルよりも低い場合に、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が増加したと判断し、及び

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも低く、且つ、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチド量が前記基準レベルと同等もしくは前記基準レベルよりも高い場合に、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が低下したと判断する。

[0053] 前記ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチドがＡβ１－ｙ（ここで、ｙ＝ｘ－６７１）であると、ＡＰＰ６６９のＮ末端側の切断活性に加えて、ＡＰＰ６６９－ｘの産生と、Ａβ１－ｙとの産生との関連性について調べられ、より多くの知見が得られるであろう。Ａβ１－ｙ（Ｎ末端がＡβ１位であるペプチド）を参照することで、ＡＰＰ６６９切断活性を特異的に評価できる。

[0054] ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質の候補物質としては、低分子化合物、ペプチド、タンパク質及び核酸などから選ばれてよい。はば広く種々の物質をスクリーニングする。

[0055] 低分子化合物としては、標的ポリペプチドに結合可能な低分子化合物が考えられる。例えば、創薬で使われているような、あるタンパク質に結合する低分子化合物が挙げられる。ＡＤＡＭＴＳ４を阻害する低分子化合物であれば、ＧＭ６００１やCalcium pentosan polysulfate等が挙げられる。

[0056] ペプチドとしては、２～５０アミノ酸残基からなるペプチドが考えられる。例えば、ＡＤＡＭＴＳ４の発現を抑制すると報告されている大豆ペプチド等が例示される。

[0057] タンパク質としては、５０アミノ酸残基以上からなるタンパク質が考えられる。例えば、ＡＤＡＭＴＳ４の発現を促進すると報告されているIL-1 cytokinesやＴＮＦ－α、ＡＤＡＭＴＳ４活性を阻害するＴＩＭＰ－３等が挙げられる。

[0058] 核酸としては、ＡＤＡＭＴＳ４をターゲットとした場合、ＡＤＡＭＴＳ４

の遺伝子発現を増加、又は減少させる核酸（ベクター、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９システム、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー）が考えられる。ＡＤＡＭＴＳ４以外の酵素をターゲットとした場合においても、その遺伝子発現を増加、又は減少させる核酸（ベクター、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９システム、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー）が考えられる。

[0059] 本発明の別の実施形態において、スクリーニング方法は、

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質をスクリーニングする方法であって、

In vitroの系で、候補物質存在下のもとＡＤＡＭＴＳ４を全長ＡＰＰ又はＡＰＰ６６９位前後の配列を含むＡＰＰ断片に作用させる工程と、

前記全長ＡＰＰ又はＡＰＰ６６９位前後の配列を含むＡＰＰ断片から産生されるＡＰＰ６６９－ｘを測定する工程と、

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程と、

を含む。

[0060] ＡＤＡＭＴＳ４がＡＰＰ６６９のＮ末端を切断する酵素の一つであるという新規な知見から、in vitroにおいて、上記の工程に従って、ＡＰＰ６６９切断活性の制御物質をスクリーニングすることも可能である。

[0061] ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の評価工程は、例えば、次のようにして行うことができる。

[0062] 前記ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程において、例えば、

前記候補物質を存在させていないコントロール系でのＡＰＰ６６９－ｘ量を基準レベルとして、

前記候補物質を存在させた系でのＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも高い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が増加したと判断し、及び

前記候補物質を存在させた系でのＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも低い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が低下したと判断する。

[0063] また、ＡＰＰ６６９－ｘの量の他に、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペ

プチドの量についても測定して、評価を行ってもよい。測定方法や、候補物質については、上述したのと同様である。

[0064] ［スクリーニング用キット］

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質をスクリーニングするためのキットであって、ＡＤＡＭＴＳ４、全長ＡＰＰ又はＡＰＰ６６９位前後の配列を含むＡＰＰ断片、その他の上述した各成分を含むキット。

[0065] ＡＰＰ６６９位前後の配列を含むＡＰＰ断片とは、ＡＰＰ６６９位前後の４アミノ酸ずつのアミノ酸配列［すなわち、ＡＰＰ６６５（Ｅ），６６６（Ｉ），６６７（Ｓ），６６８（Ｅ），６６９（Ｖ），６７０（Ｋ），６７１（Ｍ），６７２（Ｄ），及び６７３（Ａ）］を含むＡＰＰ断片のことで、Ｎ末端側及び／又はＣ末端側は、それよりも長くてもよい。ＡＤＡＭＴＳ４が認識するＡＰＰ６６９位前後の配列が含まれていればよいと考えられる。

実施例

[0066] 以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。以下において％で示される物の量は、特に断りがない場合は、その物が固体である場合は重量基準、液体である場合は体積基準で示されている。

[0067] 中性界面活性剤は、以下の略称で表す。

n-Decyl-β-D-maltoside（ＤＭ）

n-Dodecyl-β-D-maltoside（ＤＤＭ）

n-Nonyl-β-D-thiomaltoside（ＮＴＭ）

[0068] ［実施例１：Ａ５４９細胞のＡＤＡＭＴＳ４ノックアウト、及びＧＭ６００１作用による評価］

Ａ５４９細胞においてＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９（clustered regularly interspaced short palindromic repeats／CRISPR associated proteins）及びガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を用いたＡＤＡＭＴＳ４ノックアウト、及び、メタロプロテアーゼ阻害剤であるＧＭ６００１の処理によるＡＰＰ６６９－ｘ産生への影響を評価した。Ａ５４９細胞は、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞であ

る。ｇＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ Ｓｅａｒｃｈ（https://www.sanger.ac.uk/htgt/wge/find_crisprs）を用いて設計した。

[0069] ＳｐＣａｓ９ ｎｉｃｋａｓｅ及びｇＲＮＡを発現するベクターｐｘ３３５（Addgene＃42335）とレトロウイルス由来のベクターｐＢａｂｅ Ｐｕｒｏ Ｕ６ ＢｂｓＩ（Dundee大学Dario Alessi教授より供与されたもの）にＡＤＡＭＴＳ４を標的とするペアとなるｇＲＮＡをコードするｃＤＮＡを片方ずつ挿入したベクターを作出した。

[0070] ｐｘ３３５に挿入したｃＤＮＡ配列

5’-GCGCTACCTGCTAACAGTGA-3’（配列番号６）

3’-CGCGATGGACGATTGTCACT-5’（すなわち、5’-TCACTGTTAGCAGGTAGCGC-3’：配列番号７）

[0071] ｐＢａｂｅ Ｐｕｒｏ Ｕ６ ＢｂｓＩに挿入したｃＤＮＡ配列

5’-CATTCCACGGTGCGGGGCTA-3’（配列番号８）

3’-GTAAGGTGCCACGCCCCGAT-5’（すなわち、5’-TAGCCCCGCACCGTGGAATG-3’：配列番号９）

[0072] これらのベクターをトランスフェクションし、Puromycinでセレクションを行い、モノクローン化した。各モノクローナル細胞からゲノムを抽出し、ｇＲＮＡの標的となる遺伝子領域を含むゲノム断片をＰＣＲで増幅し、サンガーシーケンシングを行った。ゲノム断片を増幅するために使用したプライマーは以下の通りである。

[0073] 5’-AGTCAGGAATCCCGTGGGG-3’（配列番号１０）

3’-CCTGGGACTGGTGAAACTGTGT-5’（すなわち、5’-TGTGTCAAAGTGGTCAGGGTCC-3’：配列番号１１）

[0074] 複数のモノクローナル細胞を解析し、Ａ５４９細胞のＡＤＡＭＴＳ４遺伝子領域は３アレル存在すると推測された。そして、図２のように、ＡＤＡＭＴＳ４遺伝子の遺伝子領域を１６ｂｐ、２９ｂｐ、２０ｂｐ欠損したモノクローナル細胞を得た。いずれも３の倍数ではないことから、正常なＡＤＡＭＴＳ４タンパク質の発現が生じないと推測される。そこで、この細胞が内因

性ＡＤＡＭＴＳ４をノックアウト（ＫＯ）されたＡ５４９細胞（Ａ５４９－ＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞）であると考えられた。

[0075] 図２は、Ａ５４９－ＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞において、改変されたＡＤＡＭＴＳ４遺伝子領域の配列を示す。

[0076] 上段は、元ゲノムについての塩基配列：
GGTGGTGGCAGATGACAAGATGGCCGCATTCCACGGTGCGGGGCTAAAGCGCTACCTGCTAACAGTGATGGCAGCAGCAGCCAAGGCCTTCAAGCA（配列番号１２）を示している。

[0077] 下段は、遺伝子編集後のゲノム（３アレル）についての塩基配列：
上から、
１６ｂｐ欠損した配列：
GGTGGTGGCAGATGACAAGATGGCCGCATTCCACGCTACCTGCTAACAGTGATGGCAGCAGCAGCCAAGGCCTTCAAGCA（配列番号１３），
２９ｂｐ欠損した配列：
GGTGGTGGCAGATGACAAGATGGCCGTAGCTAACAGTGATGGCAGCAGCAGCCAAGGCCTTCAAGCA（配列番号１４），及び
２０ｂｐ欠損した配列：
GGTGGTGGCAGATGACAAGATGGCCGCATTCCAACCTGCTAACAGTGATGGCAGCAGCAGCCAAGGCCTTCAAGCA（配列番号１５）
を示している。

[0078] このＡ５４９－ＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞とＡ５４９－野生型（ｗｔ）細胞それぞれに、メタロプロテアーゼ阻害剤であるＧＭ６００１（２５μＭ）、又は、コントロールとしてジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を添加して、９６時間インキュベートした。その後、培養上清を回収し、測定まで－８０℃で保存した。

[0079] 培養上清中のＡβ関連ペプチドを免疫沈降（Immunoprecipitation；ＩＰ）と質量分析（Mass spectrometry；ＭＳ）を組み合わせたＩＰ－ＭＳを用いて測定した。ＩＰでは抗Ａβ抗体クローン6E10（BioLegend）をDynabeads Epoxy（Thermo Fisher Scientific）に共有結合させた抗体固定化ビーズを使用し

た。

[0080] 凍結保存した培養上清を融解し、内部標準ペプチドを含む反応液［８００ｍM GlcNAc、０．２％（ｗ／ｖ） ＮＴＭ、０．２％（ｗ／ｖ） ＤＤＭ、３００ｍM ＮａＣｌ、１００ｍM Tris-HCl buffer（ｐＨ７．４）］２５０μＬと培養上清２５０μＬを混合した。混合液を抗体固定化ビーズと混ぜて、１時間、４℃で抗原抗体反応させた。内部標準ペプチドとして、２２ｐM安定同位体標識Ａβ１－３８と１００ｐM安定同位体標識Ａβ１－１５を使用した。

[0081] 抗原抗体反応後、抗体固定化ビーズを第一洗浄緩衝液で洗浄した［第一洗浄緩衝液（０．１％ ＤＤＭ、０．１％ ＮＴＭ、５０ｍM Tris-HCl（ｐＨ７．４）、１５０ｍM ＮａＣｌ）１００μＬで１回洗浄し、５０ｍM酢酸アンモニウム緩衝液５０μＬで１回洗浄］。その後、抗体固定化ビーズに捕捉されたＡβ関連ペプチドをＤＤＭを含むグリシン緩衝液（０．１％ ＤＤＭを含有する５０ ｍM Glycine buffer, ｐＨ２．８）で溶出した。得られた溶出液にＤＤＭを含むトリス緩衝液［８００ｍM GlcNAc、０．２％（ｗ／ｖ）ＤＤＭ、３００ｍM ＮａＣｌ、３００ｍMTris-HCl buffer（ｐＨ７．４）］を加えてｐＨを中性（ｐＨ７．４）に戻した。その後、もう一度、中性の溶出液を抗体固定化ビーズと１時間、４℃で接触させて、Ａβ関連ペプチドを抗原抗体反応させ、第二洗浄緩衝液で洗浄［第二洗浄緩衝液（０．１％ ＤＤＭ、１５０ｍM Tris-HCl（ｐＨ７．４）、１５０ｍM ＮａＣｌ）１００μＬで２回洗浄し、５０ｍM酢酸アンモニウム緩衝液５０μＬで１回洗浄］後、抗体固定化ビーズに捕捉されたＡβ関連ペプチドを溶出液（５ｍM ＨＣｌ，０．１ｍM Methionine, ７０％（ｖ／ｖ）アセトニトリル）で溶出した。このようにして、２段階ＩＰ操作によるＡβ関連ペプチドを含む各溶出液を得た。

[0082] Ｌｉｎｅａｒ ＴＯＦ用のマトリックスとして、α-cyano-4-hydroxycinnamic acid（ＣＨＣＡ）を用いた。マトリックス溶液は、ＣＨＣＡ １ｍｇを７０％（ｖ／ｖ）アセトニトリル１ｍＬで溶解することによって調製した。マ

トリックス添加剤として、０．４％（ｗ／ｖ） methanediphosphonic acid（ＭＤＰＮＡ）を用いた。１ｍｇ／ｍＬ ＣＨＣＡ溶液と０．４％（ｗ／ｖ）ＭＤＰＮＡを等量混合し、マトリックス／マトリックス添加剤溶液［０．５ｍｇ／ｍＬ ＣＨＣＡ／０．２％（ｗ／ｖ）ＭＤＰＮＡ］を得た。

[0083] 予め、マトリックス／マトリックス添加剤溶液の０．５μＬをμFocus MALDI plate™ 900 μm (Hudson Surface Technology, Inc., Fort Lee, NJ)の各ｗｅｌｌ上へ滴下し、乾燥させた。

[0084] 上記μFocus MALDI plate™ 900 μmの４ｗｅｌｌ上へ、ＩＰ後の各溶出液を滴下して乾燥させた。

[0085] マススペクトルデータはＡＸＩＭＡ Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ(Shimadzu/KRATOS, Manchester, UK)を用いて、ポジティブイオンモードのＬｉｎｅａｒ ＴＯＦで取得した。Ｌｉｎｅａｒ ＴＯＦのｍ／ｚ値はピークのアベレージマスで表示した。ｍ／ｚ値は外部標準として、human angiotensin IIとhuman ACTH fragment 18-39、bovine insulin oxidized beta-chain、bovine insulinを用いてキャリブレーションした。

[0086] マススペクトルにおいて、各Ａβ関連ペプチドのシグナル強度に対して、内部標準ペプチドを用いて標準化した。その後、１サンプルから得られる４つのマススペクトルの標準化強度（Normalized intensity）の平均値を求め、それをＡβ関連ペプチド産生量として評価した。検出下限に達しない（Ｓ／Ｎ＜３）データ数が２つ以上存在した場合は、検出不可とした。

[0087] 結果を図３～６に示す。図３～６は、Ａ５４９－ＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞とＡ５４９－ｗｔ細胞それぞれに、ＧＭ６００１（２５μＭ）、又は、コントロールとしてＤＭＳＯを添加したときの培養上清中のＡβ関連ペプチド産生量を表すグラフであり、縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。図３は、ＡＰＰ６６９－７１１産生量に関するグラフであり、図４は、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフであり、図５は、Ａβ１－４０産生量に関するグラフであり、図６は、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[0088] Ａ５４９－ＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞のＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８））の産生量は、Ａ５４９－ｗｔ細胞と比べると半分以下に低下していた（図３及び４）。一方、ＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０）とＮ末端側が異なり、Ｃ末端側は同じＡβ１－４０、及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８））とＮ末端側が異なり、Ｃ末端側は同じＡβ１－３８の産生量は、逆にＡ５４９－ＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞ではＡ５４９－ｗｔ細胞と比べると若干増加する傾向にあった（図５及び６）。ＡＤＡＭＴＳ４のノックアウトによりＡＰＰ６６９をＮ末端とするペプチドの産生量が低下した結果は、ＡＤＡＭＴＳ４がＡＰＰ６６９のＮ末端の切断に関与していることを示している。

[0089] さらに、メタロプロテアーゼ阻害剤であるＧＭ６００１を作用させると、Ａ５４９－ＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞とＡ５４９－ｗｔ細胞のいずれにおいても、コントロールのＤＭＳＯに比べてＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８））の産生量は半分程度に減少し、Ａβ１－４０とＡβ１－３８の産生量は僅かに増加する傾向にあった（図３～６）。ＡＤＡＭＴＳ４はメタロプロテアーゼであり、ＧＭ６００１により阻害されることが知られている。このことから、ＧＭ６００１によりＡＤＡＭＴＳ４活性が阻害されて、ＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８））の産生量が減少したと考えられる。

[0090] これらは、ＡＤＡＭＴＳ４がＡＰＰ６６９切断（Ｎ末端側）に関与していることを示す結果であるとともに、本手法を用いてＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及び／又はＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８））の低下を捉えることにより、ＡＰＰ６６９切断活性の減少を評価できることを示している。ただし、ＡＰＰ６６９のＮ末端を切断する酵素はＡＤＡＭＴＳ４以外にも存在すると考えられる。その理由は、ＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞でもＡＰＰ６６９－ｘが完全に消失しなかったこと、そしてＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞にＧＭ６００１を作用させるとＡＰＰ６６９－ｘが減少したか

らであり、未知のメタロプロテアーゼがＡＤＡＭＴＳ４ ＫＯ細胞におけるＡＰＰ６６９－ｘ産生に関わっていることを示す結果でもある。

[0091] 表１に、Ａβ１－３８、Ａβ１－４０、ＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８））、及びＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））のアミノ酸配列を示す。

[0092] [表1]

配列番号	ペプチド名	Sequence
1	Aβ1-38	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG
2	Aβ1-40	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
3	APP669-709 (Aβ-3-38)	VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG
4	APP669-711 (Aβ-3-40)	VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

[0093] ［実施例２：ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫ細胞のＡＤＡＭＴＳ４ transfectionによる評価］

ＡＤＡＭＴＳ４過剰発現によるＡＰＰ６６９－ｘ産生への影響を評価した。

[0094] ヒトＡＰＰを発現するベクターとして哺乳類細胞発現用ベクターｐｃＤＮＡ３．１にヒトＡＰＰ（６９５アミノ酸アイソフォーム）のｃＤＮＡが挿入されたものを用い（非特許文献７）、Human Embryonic Kidney cells 293（ＨＥＫ細胞）にヒトＡＰＰを安定発現させたＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫを作製した。また、ヒト神経芽細胞腫由来細胞ＢＥ２（Ｃ）細胞（ATCCより購入）の全ｍＲＮＡからｃＤＮＡライブラリーを作出し、ＰＣＲによりヒトＡＤＡＭＴＳ４遺伝子のクローニングを行った。

[0095] クローニングに用いたプライマー

5’-GGAGACCCAAGCTGGaccatgtcccagacaggctcgc-3’（配列番号１６）

3’-ggacccgcccgtcctttattCGCAAATTTGAATTCGAACCA-5’（すなわち、5’-ACCAAGCTTAAGTTTA

AACGCttatttcctgcccgcccagg-3’：配列番号１７）

[0096] 上記のプライマーの配列において、元ベクターにＡＤＡＭＴＳ４の配列を

インサートする際に、元ベクターとオーバーラップさせた配列を大文字で表記し、ＡＤＡＭＴＳ４の配列を小文字として表記している。なお、小文字の最初の文字accは、ＡＤＡＭＴＳ４自体の配列ではないが、ＡＤＡＭＴＳ４の翻訳効率を上げるためのコザック配列（acc）を入れている。

[0097] ｐｃＤＮＡ３．１のネオマイシン／カナマイシン耐性遺伝子をハイグロマイシン耐性遺伝子に置き換えたｐｃＤＮＡ３．１ hygro+ vectorにヒトＡＤＡＭＴＳ４のｃＤＮＡをHiFi Assembly により挿入しＡＤＡＭＴＳ４ plasmid vectorを作出した。得られたｃＤＮＡ配列を配列番号１８として示し、それにコードされているアミノ酸配列を配列番号１９として示す。このｃＤＮＡはデータベースに登録されているＡＤＡＭＴＳ４遺伝子配列ＮＰ＿００５０９０．３と１００％一致した。なお、ＡＤＡＭＴＳ４遺伝子には２つのＳＮＰが存在しており（ｒｓ４２３３３６７、ｒｓ４１２７００４１）、それぞれアミノ酸置換（Ｑ６２６Ｒ、Ｐ７２０Ａ）を生じる。

[0098] このvectorとempty pcDNA3.1 hygro+ vectorを１：１０および１０：１の割合でco-transfectionした。コントロールとして、vectorをtransfectionしていない細胞（mock）とempty pcDNA3.1 hygro+ vectorのみをtransfectionした細胞（empty）も用意した。６時間後、新しいＤＭＥＭ培地に換え、４８時間後に培養上清を回収した。その培養上清を実施例１と同様のＩＰ－ＭＳで測定した。ただし、ＩＰの抗体は抗Ａβ抗体クローン4G8（Bio Legend）を用い、内部標準ペプチドは２２ｐＭ安定同位体標識Ａβ１－３８のみを使用した。

[0099] 結果を図７～１０に示す。図７～１０は、ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫにＡＤＡＭＴＳ４ plasmid vector とempty pcDNA3.1 hygro+ vectorとを１：１０および１０：１の割合でco-transfectionしたときの培養上清中のＡβ関連ペプチド産生量を表すグラフであり、vectorをtransfectionしていない細胞（mock）とempty pcDNA3.1 hygro+ vectorのみをtransfectionした細胞（empty）をコンロトールとした。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。図７は、ＡＰＰ６６９－７１１産生量に関するグラフであ

り、図８は、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフであり、図９は、Ａβ１－４０産生量に関するグラフであり、図１０は、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[0100] ＡＤＡＭＴＳ４ plasmid vector とempty pcDNA3.1 hygro+ vectorを１０：１の割合でco-transfectionして、ＡＤＡＭＴＳ４を過剰発現させた細胞ではＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８））の産生量が若干増加する傾向が見られた（図７及び８）。一方、ＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０）とＮ末端側が異なり、Ｃ末端側は同じＡβ１－４０、及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８））とＮ末端側が異なり、Ｃ末端側は同じＡβ１－３８の産生量は増加せず、若干低下する傾向があった（図９及び１０）。ＡＤＡＭＴＳ４の過剰発現によりＡＰＰ６６９をＮ末端とするペプチドが増加したことは、ＡＤＡＭＴＳ４がＡＰＰ６６９切断（Ｎ末端側）に関与していることを支持する結果となっている。

[0101] ［実施例３：不活性型ＡＤＡＭＴＳ４（Ｅ３６２Ａ）の評価］

ＡＤＡＭＴＳ４と不活性型ＡＤＡＭＴＳ４（Ｅ３６２Ａ）の過剰発現によるＡＰＰ６６９－ｘ産生への影響を比較した。

[0102] ＡＤＡＭＴＳ４＿Ｅ３６２ＡはＡＤＡＭＴＳ４の活性中心であるアミノ酸配列３６２番目のグルタミン酸（Ｅ）をアラニン（Ａ）に置換した、不活性型の変異体である。そこでＰＣＲ法によりＡＤＡＭＴＳ４＿Ｅ３６２Ａ vectorを作出した。

[0103] Ｅ３６２Ａ変異体作出に用いたプライマー

5’-cactgctgctcatgcgctgggtcatgtct-3’（配列番号２０）

3’-gtgacgacgagtacgcgacccagtacaga-5’（すなわち、5’-agacatgacccagcgcatgagcagcagtg-3’：配列番号２１）

[0104] ヒトＡＰＰ vectorと共に、ｐｃＤＮＡ３．１ hygro+ vectorにＥＧＦＰを挿入した空ベクター（ＥＧＦＰ vector）、ＡＤＡＭＴＳ４ vector、またはＡＤＡＭＴＳ４＿Ｅ３６２Ａ vectorをＨＥＫ細胞へco-transfectionした。

ＥＧＦＰ vectorはコントロールとして用いた。何もtransfectionしていないmockもコントロールとして用いた。９６時間インキュベートした後、培養上清を回収し、実施例１と同様のＩＰ－ＭＳで測定した。

[0105] 結果を図１１～１４に示す。図１１～１４は、ＨＥＫ細胞へヒトＡＰＰと共にＥＧＦＰ、ＡＤＡＭＴＳ４、および不活性型ＡＤＡＭＴＳ４＿Ｅ３６２Ａをco-transfectionしたときの培養上清中のＡβ関連ペプチド産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。図１１は、ＡＰＰ６６９－７１１産生量に関するグラフであり、図１２は、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフであり、図１３は、Ａβ１－４０産生量に関するグラフであり、図１４は、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[0106] ＡＤＡＭＴＳ４ plasmid vectorをtransfectionして、ＡＤＡＭＴＳ４を過剰発現させた細胞では実施例２と同様に、ＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８）の産生量が増加する傾向が見られた（図１１及び１２）。一方、Ａβ１－４０、及びＡβ１－３８の産生量には変化がなかった。不活性型のＡＤＡＭＴＳ４＿Ｅ３６２Ａを過剰発現させた細胞では、ＥＧＦＰを過剰発現させたコントロール細胞と同等のＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８）の産生量を示した。

[0107] この結果や、実施例１，２の結果を総合すると、ＡＤＡＭＴＳ４がＡＰＰ６６９切断（Ｎ末端側）酵素の一つであると考えられる。また、本実施例３ではＡＤＡＭＴＳ４の活性、又は不活性の影響がＡＰＰ６６９－ｘの産生量にも反映していることから、ＡＰＰ６６９－ｘの産生量を測定することによりＡＤＡＭＴＳ４を含むＡＰＰ６６９切断活性の変化も捉えることができ、ＡＰＰ６６９切断活性の制御物質のスクリーニングに利用可能と考えられる。

[0108] ［実施例４：ＡＰＰ６６９切断活性を制御する化合物の評価］

メタロプロテアーゼ阻害剤によるＡＰＰ６６９－ｘ産生への影響を評価し

た。

[0109] ヒト神経芽細胞腫ＢＥ（２）－Ｃ、及び、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞Ａ５４９へ、メタロプロテアーゼ阻害剤２５μＭ ＧＭ６００１（コスモ・バイオ）、又は１０μＭ ＩＮＣＢ３６１９（非特許文献８）を作用させ、又は、コントロールとしてＤＭＳＯを添加し、９６時間インキュベートした。その後、培養上清を回収し、実施例１と同様のＩＰ－ＭＳで測定した。ただし、内部標準ペプチドは２０ｐＭ安定同位体標識Ａβ１－３８と１００ｐＭ安定同位体標識Ａβ１－１５を使用した。

[0110] ＢＥ（２）－Ｃ細胞についての結果を図１５～１８に示す。図１５～１８は、ＢＥ（２）－Ｃ細胞へ２５μＭ ＧＭ６００１、又は１０μＭ ＩＮＣＢ３６１９を作用させたときの培養上清中のＡβ関連ペプチド産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。図１５は、ＡＰＰ６６９－７１１産生量に関するグラフであり、図１６は、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフであり、図１７は、Ａβ１－４０産生量に関するグラフであり、図１８は、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[0111] Ａ５４９細胞についての結果を図１９～２２に示す。図１９～２２は、Ａ５４９細胞へ２５μＭ ＧＭ６００１、又は１０μＭ ＩＮＣＢ３６１９を作用させたときの培養上清中のＡβ関連ペプチド産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。図１９は、ＡＰＰ６６９－７１１産生量に関するグラフであり、図２０は、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフであり、図２１は、Ａβ１－４０産生量に関するグラフであり、図２２は、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[0112] ＢＥ（２）－Ｃ細胞及びＡ５４９細胞いずれの場合においても、ＧＭ６００１の作用によりＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８）の産生量が減少したが、Ａβ１－４０及びＡβ１－３８の産生量は減少しなかった。これらのことから、ＧＭ６００１がＡＰＰ６６９切断活性（Ｎ末端側）を低下させることが分かる。一方

、ＩＮＣＢ３６１９による影響を確認すると、ＢＥ（２）－Ｃ細胞のＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８）の産生量は若干減少したが、Ａ５４９細胞では変化がなかった。これらのことから、ＩＮＣＢ３６１９はＡＰＰ６６９切断活性（Ｎ末端側）を低下させる効果は低いことが分かる。このようにして、化合物ごとのＡＰＰ６６９切断活性への影響を評価することができる。

[0113] また、ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫ細胞についても、上記操作と同様に、２５μＭ ＧＭ６００１を作用させ、ＩＰ－ＭＳで測定した。

[0114] ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫ細胞についての結果を図２３～２６に示す。図２３～２６は、ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫ細胞へ２５μＭ ＧＭ６００１を作用させたときの培養上清中のＡβ関連ペプチド産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。図２３は、ＡＰＰ６６９－７１１産生量に関するグラフであり、図２４は、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフであり、図２５は、Ａβ１－４０産生量に関するグラフであり、図２６は、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[0115] ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫ細胞の場合においても、ＧＭ６００１の作用によりＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８）の産生量が減少したが、Ａβ１－４０及びＡβ１－３８の産生量は減少しなかった。

[0116] ［実施例５：ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫ細胞のＭＴ－ＭＭＰ transfectionによる評価］

メタロプロテアーゼであるＭＴ－ＭＭＰ１，２，３，４，５，又は６によるＡＰＰ６６９－ｘ産生への影響を評価した。

[0117] 哺乳類細胞発現用ベクターｐＣＥＰ４に、ＦＬＡＧタグを付加したヒトＭＴ－ＭＭＰ１、ＭＴ－ＭＭＰ２、ＭＴ－ＭＭＰ３、ＭＴ－ＭＭＰ４、ＭＴ－ＭＭＰ５、又はＭＴ－ＭＭＰ６が挿入された発現ベクターは、清木元治招聘特任教授（金沢大学）よりご供与いただいた。

[0118] ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫ細胞に対して、ＭＴ－ＭＭＰ１，２，３，４，５，又は６のvectorをtransfectionして９６時間後に、培養上清を回収し、実施例１と同様のＩＰＭＳで測定した。コントロールとして、vectorをtransfectionしていない細胞（mock）を用いた。

[0119] 結果を図２７～３０に示す。図２７～３０は、ＡＰＰ ｓｔａｂｌｅ ＨＥＫ細胞に対して、ＭＴ－ＭＭＰ１，２，３，４，５，又は６のvectorをtransfectionしたときの培養上清中のＡβ関連ペプチド産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。図２７は、ＡＰＰ６６９－７１１産生量に関するグラフであり、図２８は、ＡＰＰ６６９－７０９産生量に関するグラフであり、図２９は、Ａβ１－４０産生量に関するグラフであり、図３０は、Ａβ１－３８産生量に関するグラフである。

[0120] ＭＴ－ＭＭＰ１，２，３，５，又は６をtransfectionした細胞では、ＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８）の両方の産生量が減少していた。一方、これらとＮ末端側が異なり、Ｃ末端側は同じＡβ１－４０とＡβ１－３８の産生量も同様に減少していた。ＭＴ－ＭＭＰ２や３はＡβを分解するという報告がある（非特許文献９）。したがって、ＭＴ－ＭＭＰ１，２，３，５，又は６が、ＡＰＰ６６９－ｘのみならずＡβ１－ｘをも分解して、これらＡβ関連ペプチド産生量が減少した結果と考えられる。このように、ＡＰＰ６６９位以外での切断があった場合は、Ａβ１－ｘも同様の変動が確認される。したがって、Ａβ１－ｘの変化も参照することが、ＡＰＰ６６９切断活性が変動しているのか、その他の切断が変動しているのかの判別に有効である。

[0121] ［実施例６：ＡＰＰ，ｃ１０２，ｃ９９ transfectionによるβサイト切断評価］

ＡＰＰ６６９切断後のｃ１０２にβ－セクレターゼ（ＢＡＣＥ１）によるβサイト切断が生じるかどうかを評価した。

[0122] ｃ１０２とは、Ｎ末端がＡＰＰ６６９で、Ｃ末端がＡＰＰのＣ末端である

タンパク質であり、ＡＰＰ６６９切断後のＣ末端側のタンパク質である。ｃ９９とはβサイト切断後のＣ末端側のタンパク質（図１を参照すると、β－ＣＴＦ）である。

[0123] 膜に挿入されたｃ９９を発現させるベクターとしては、ＡＰＰのシグナル配列に続いて２アミノ酸（ＤＡ）が付与されたＳＰＡ４ＣＴをコードするｃＤＮＡ（非特許文献１０）が哺乳類細胞発現用ベクターｐｃＤＮＡ４に挿入されたものを用いた（非特許文献１１）。このベクターに対してｃ９９配列の前に３アミノ酸（ＶＫＭ）付加したｃ１０２を発現するベクターは、ＰＣＲ法により作出した。Ｆｕｌｌ ｌｅｎｇｔｈであるＡＰＰ、ｃ１０２、又はｃ９９をＨＥＫ細胞にtransfectionした。コントロールとして、transfectionしていないＨＥＫ細胞（no）も評価した。９６時間後に培養上清を回収し、実施例１と同様のＩＰ－ＭＳで測定した。ただし、内部標準ペプチドは２０ｐＭ安定同位体標識Ａβ１－３８と１００ｐＭ安定同位体標識Ａβ１－１５を使用した。

[0124] 結果を図３１に示す。図３１は、ＨＥＫ細胞に対して、Ｆｕｌｌ ｌｅｎｇｔｈ ＡＰＰ、ｃ１０２、又はｃ９９をtransfectionしたときの培養上清中のＡβ関連ペプチド（ＡＰＰ６６９－７０９、ＡＰＰ６６９－７１１、Ａβ１－３８、Ａβ１－４０）の産生量を表すグラフである。縦軸は標準化強度（Normalized intensity）の平均値である。各Ａβ関連ペプチドにおいて、左側から順に、コントロール（no）、Ｆｕｌｌ ｌｅｎｇｔｈのＡＰＰのtransfection、ｃ１０２のtransfection、ｃ９９のtransfectionの結果を示している。ＡＰＰ６６９－７０９の産生量は、コントロール（no）、ｃ９９では少なすぎて棒グラフに表れていない。また、ＡＰＰ６６９－７１１の産生量は、コントロール（no）、ｃ９９では少なすぎて棒グラフに表れていない。

[0125] ｃ１０２過剰発現ではＡＰＰ６６９－７１１（Ａβ（－３－４０））及びＡＰＰ６６９－７０９（Ａβ（－３－３８）の産生量が最も多く、ｃ９９過剰発現ではＡβ１－４０及びＡβ１－３８の産生量が最も多かった。Ｆｕｌｌ ｌｅｎｇｔｈ ＡＰＰ過剰発現ではコントロール細胞と比べて、いずれの

Ａβ関連ペプチドも増加していた。これは過剰発現させたＦｕｌｌ ｌｅｎｇｔｈ ＡＰＰから、ＡＰＰ６６９－７１１、ＡＰＰ６６９－７０９、Ａβ１－４０、Ａβ１－３８などが生成されていることを示す。しかし、ｃ１０２過剰発現では、コントロール細胞と比べてＡβ１－４０やＡβ１－３８は増加していなかった。つまり、ＡＰＰ６６９切断（Ｎ末端側）後のｃ１０２に対してはβサイト切断を受けないことを示している。つまり、ＡＰＰ６６９切断活性を促進させることができれば、Ａβ１－４０やＡβ１－４２を含むＡβ１－ｘの産生を抑制する可能性を示している。

[0126] （１）

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質をスクリーニングする方法であって、

候補物質を培養細胞に作用させる工程と、

前記培養細胞から産生されるＡβ関連ペプチドを測定する工程と、

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程と、

を含む、スクリーニング方法。

[0127] （２）

前記Ａβ関連ペプチドがＡＰＰ６６９－ｘである、上記（１）に記載の方法。

[0128] （３）

前記ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程において、

前記候補物質を作用させていないコントロール細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量を基準レベルとして、

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも高い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が増加したと判断し、及び

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも低い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が低下したと判断する、上記（２）に記載の方法。

[0129] （４）

前記Ａβ関連ペプチドが、ＡＰＰ６６９－ｘ、及び、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチドである、上記（１）に記載の方法。

[0130] （５）

前記ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程において、

前記候補物質を作用させていないコントロール細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量及びＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチド量の各量を基準レベルとして、

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも高く、且つ、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチド量が前記基準レベルと同等もしくは前記基準レベルよりも低い場合に、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が増加したと判断し、及び

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも低く、且つ、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチド量が前記基準レベルと同等もしくは前記基準レベルよりも高い場合に、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が低下したと判断する、上記（４）に記載の方法。

[0131] （６）

前記ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチドがＡβ１－ｙ（ここで、ｙ＝ｘ－６７１）である、上記（４）又は（５）に記載の方法。

[0132] （７）

前記候補物質が、低分子化合物、ペプチド、タンパク質及び核酸からなる群から選ばれる、上記（１）～（６）のいずれかに記載の方法。

[0133] （８）

前記候補物質が、ＡＤＡＭＴＳ４をターゲットに設計された低分子化合物、ペプチド、タンパク質及び核酸からなる群から選ばれる、上記（１）～（７）のいずれかに記載の方法。

[0134] （９）

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質をスクリーニングする方法であって、

In vitroの系で、候補物質存在下のもとＡＤＡＭＴＳ４を全長ＡＰＰ又はＡＰＰ６６９位前後の配列を含むＡＰＰ断片に作用させる工程と、

前記全長ＡＰＰ又はＡＰＰ６６９位前後の配列を含むＡＰＰ断片から産生されるＡＰＰ６６９－ｘを測定する工程と、

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程と、

を含む、スクリーニング方法。

[0135] （１０）

前記ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程において、

前記候補物質を存在させていないコントロール系でのＡＰＰ６６９－ｘ量を基準レベルとして、

前記候補物質を存在させた系でのＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも高い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が増加したと判断し、及び

前記候補物質を存在させた系でのＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも低い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が低下したと判断する、上記（９）に記載の方法。

[0136] （１１）

前記候補物質が、低分子化合物、ペプチド、タンパク質及び核酸からなる群から選ばれる、上記（９）又は（１０）に記載の方法。

[0137] （１２）

ＡＤＡＭＴＳ４を含むＡＰＰ６６９のＮ末端切断剤。

[0138] （１３）

In vitroの系において、ＡＤＡＭＴＳ４をＡＰＰ６６９のＮ末端切断剤として使用する方法。

[0139] （１４）

In vitroの系における、ＡＤＡＭＴＳ４のＡＰＰ６６９のＮ末端切断剤としての使用。

請求の範囲

[請求項1] ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質をスクリーニングする方法であって、

候補物質を培養細胞に作用させる工程と、

前記培養細胞から産生されるＡβ関連ペプチドを測定する工程と、

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程と、

を含む、スクリーニング方法。

[請求項2] 前記Ａβ関連ペプチドがＡＰＰ６６９－ｘである、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程において、

前記候補物質を作用させていないコントロール細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量を基準レベルとして、

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも高い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が増加したと判断し、及び

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも低い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が低下したと判断する、請求項２に記載の方法。

[請求項4] 前記Ａβ関連ペプチドが、ＡＰＰ６６９－ｘ、及び、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチドである、請求項１に記載の方法。

[請求項5] 前記ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程において、

前記候補物質を作用させていないコントロール細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量及びＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチド量の各量を基準レベルとして、

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも高く、且つ、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチド量が前記基準レベルと同等もしくは前記基準レベルよりも低い場合に、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が増加したと判断し、及び

前記候補物質を作用させた細胞のＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも低く、且つ、ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチド量が前記基準レベルと同等もしくは前記基準レベルよりも高い場合に、ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が低下したと判断する、請求項４に記載の方法。

[請求項6] 前記ＡＰＰ６６９－ｘ以外のＡβ関連ペプチドがＡβ１－ｙ（ここで、ｙ＝ｘ－６７１）である、請求項４又は５に記載の方法。

[請求項7] 前記候補物質が、低分子化合物、ペプチド、タンパク質及び核酸からなる群から選ばれる、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。

[請求項8] 前記候補物質が、ＡＤＡＭＴＳ４をターゲットに設計された低分子化合物、ペプチド、タンパク質及び核酸からなる群から選ばれる、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項9] ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性の制御物質をスクリーニングする方法であって、

In vitroの系で、候補物質存在下のもとＡＤＡＭＴＳ４を全長ＡＰＰ又はＡＰＰ６６９位前後の配列を含むＡＰＰ断片に作用させる工程と、

前記全長ＡＰＰ又はＡＰＰ６６９位前後の配列を含むＡＰＰ断片から産生されるＡＰＰ６６９－ｘを測定する工程と、

ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程と、

を含む、スクリーニング方法。

[請求項10] 前記ＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性を評価する工程において、

前記候補物質を存在させていないコントロール系でのＡＰＰ６６９－ｘ量を基準レベルとして、

前記候補物質を存在させた系でのＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レベルよりも高い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が増加したと判断し、及び

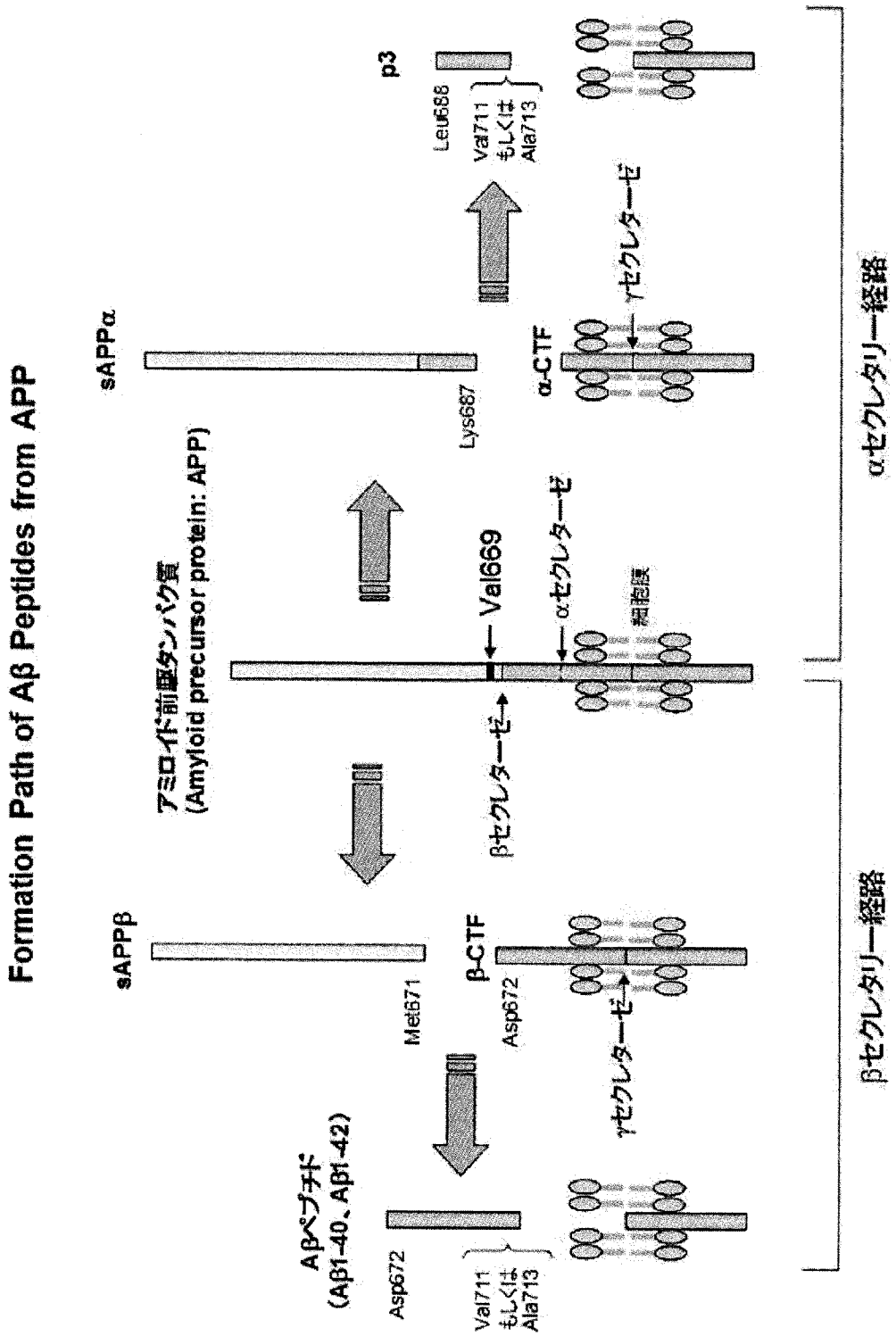
前記候補物質を存在させた系でのＡＰＰ６６９－ｘ量が前記基準レ

ベルよりも低い場合にＡＰＰ６６９のＮ末端切断活性が低下したと判断する、請求項９に記載の方法。

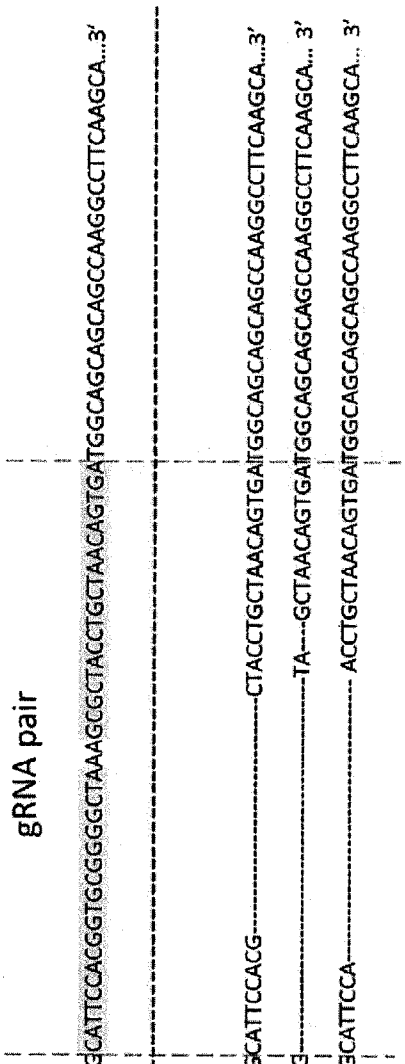
[請求項11] 前記候補物質が、低分子化合物、ペプチド、タンパク質及び核酸からなる群から選ばれる、請求項９又は１０に記載の方法。

[請求項12] ＡＤＡＭＴＳ４を含むＡＰＰ６６９のＮ末端切断剤。

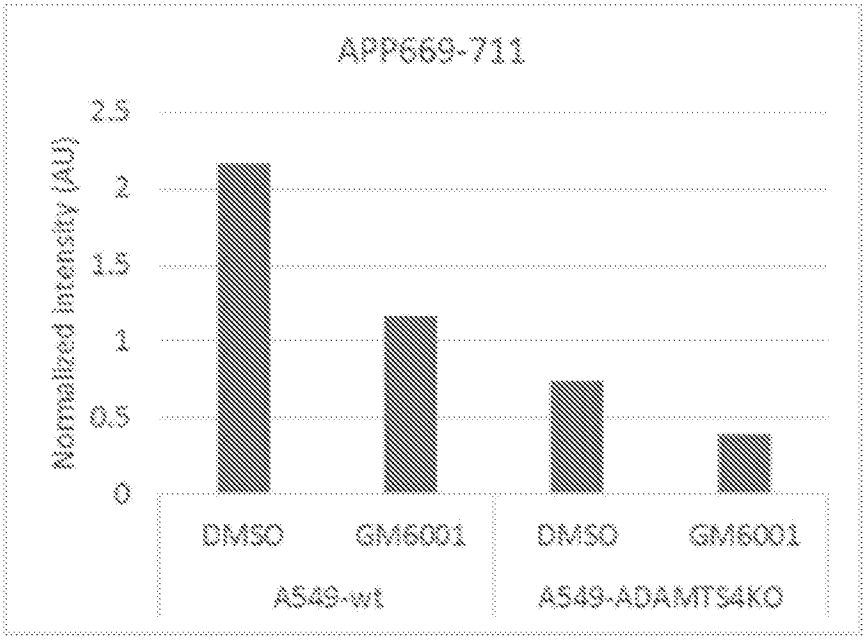
[図1]


Formation Path of Aβ Peptides from APP
sAPPα
Lys687
p3
Leu688
Val711
もしくは
Ala713
α-CTF
γセクレターゼ
アミロイド前駆タンパク質
(Amyloid precursor protein: APP)
Val669
αセクレターゼ
細胞膜
βセクレターゼ
sAPPβ
Met671
β-CTF
Asp672
γセクレターゼ
Aβペプチド
(Aβ1-40、Aβ1-42)
Asp672
Val711
もしくは
Ala713
αセクレタリー経路
βセクレタリー経路

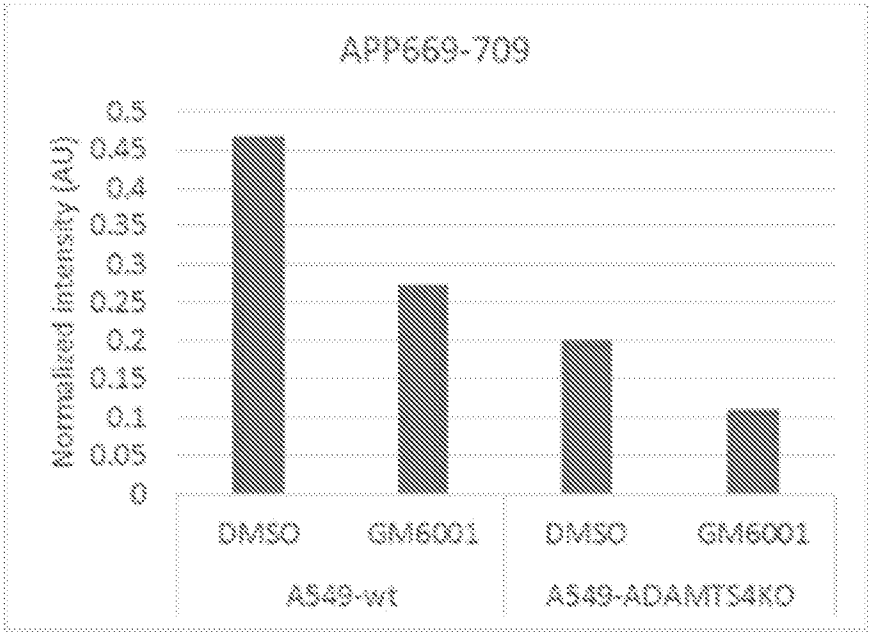
[図2]


元ゲノム
gRNA pair
5'...GGTGGTGGCAGATGACAAGATGGCCGCATTCCACGGTGCGGGGCTAAAGCGCTACCTGCTAACAGTGATGGCAGCAGCCAAGGCCTTCAAGCA...3'
遺伝子編集後のゲノム
5'...GGTGGTGGCAGATGACAAGATGGCCGCATTCCACG----------CTACCTGCTAACAGTGATGGCAGCAGCCAAGGCCTTCAAGCA...3'
5'...GGTGGTGGCAGATGACAAGATGGCCG----------TA---GCTAACAGTGATGGCAGCAGCCAAGGCCTTCAAGCA... 3'
5'...GGTGGTGGCAGATGACAAGATGGCCGCATTCCA---------- ACCTGCTAACAGTGATGGCAGCAGCCAAGGCCTTCAAGCA... 3'

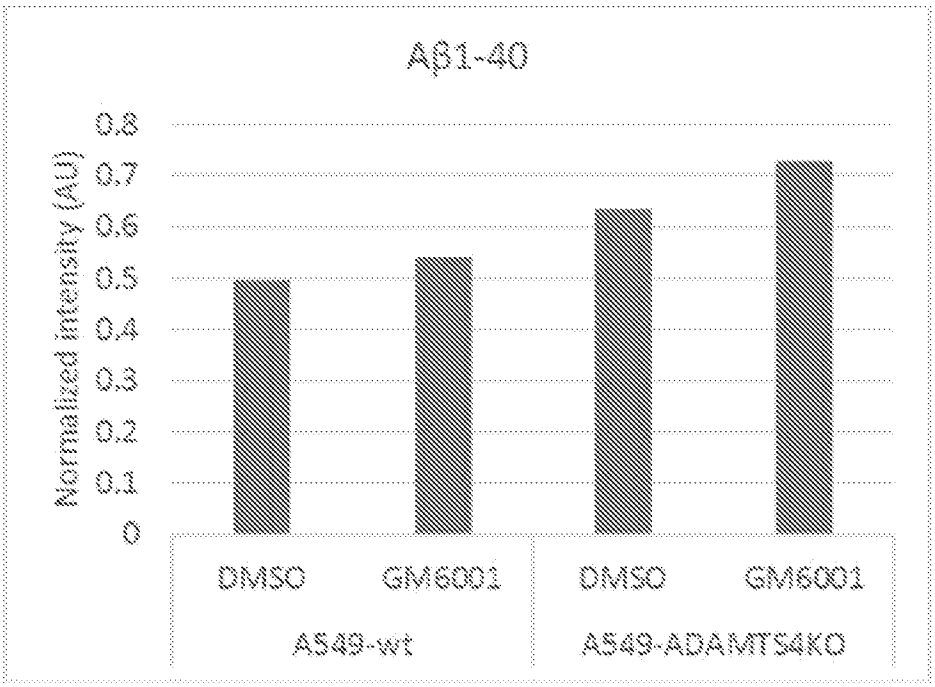
[図3]


APP669-711
Normalized intensity (AU)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
DMSO
GM6001
DMSO
GM6001
A549-wt
A549-ADAMTS4KO

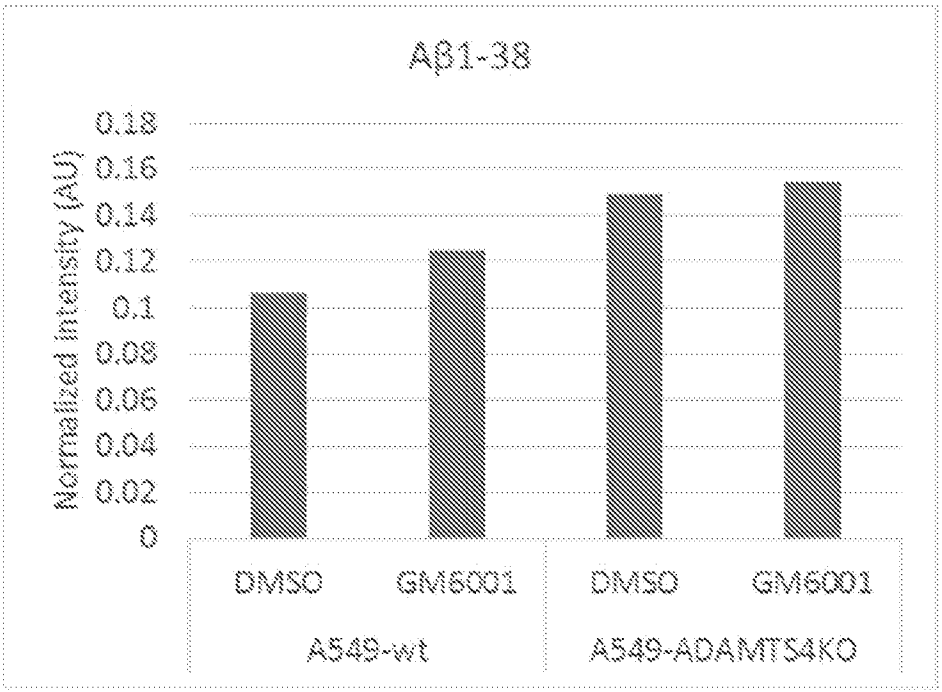
[図4]


APP669-709
Normalized intensity (AU)
0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
DMSO
GM6001
DMSO
GM6001
A549-wt
A549-ADAMTS4KO

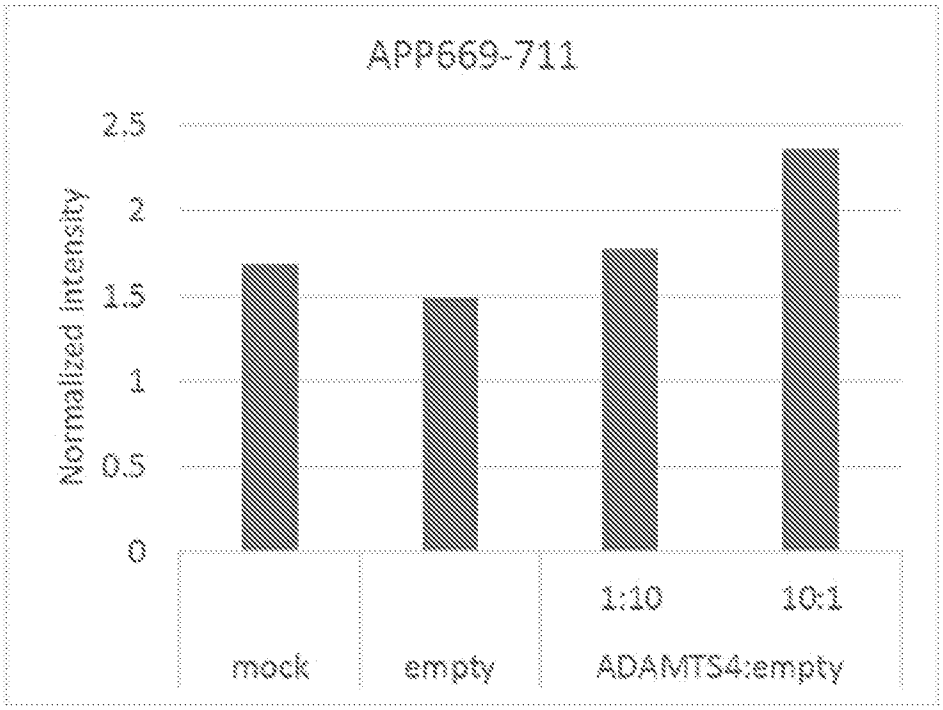
[図5]


Aβ1-40
Normalized intensity (AU)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
DMSO
GM6001
DMSO
GM6001
A549-wt
A549-ADAMTS4KO

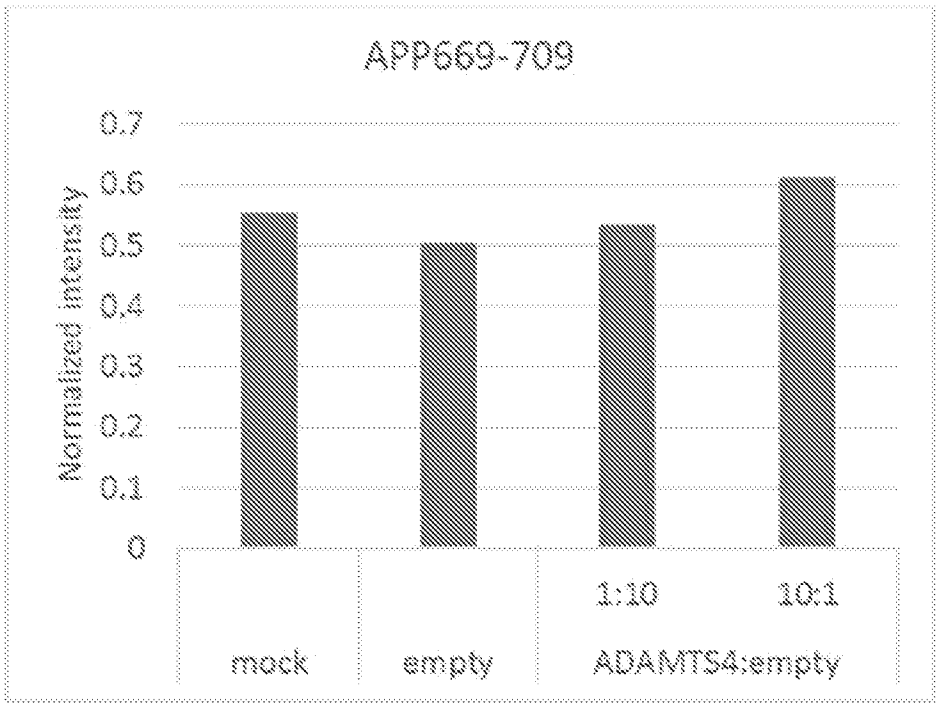
[図6]


Aβ1-38
Normalized intensity (AU)
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
DMSO
GM6001
DMSO
GM6001
A549-wt
A549-ADAMTS4KO

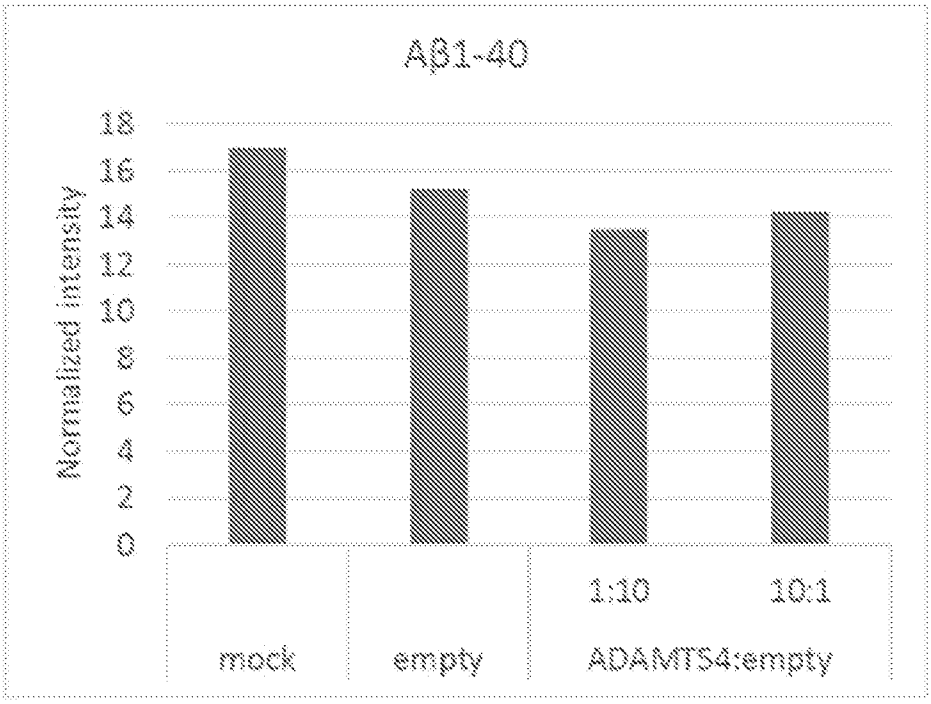
[図7]


APP669-711
Normalized intensity
2.5
2
1.5
1
0.5
0
mock
empty
1:10
10:1
ADAMTS4:empty

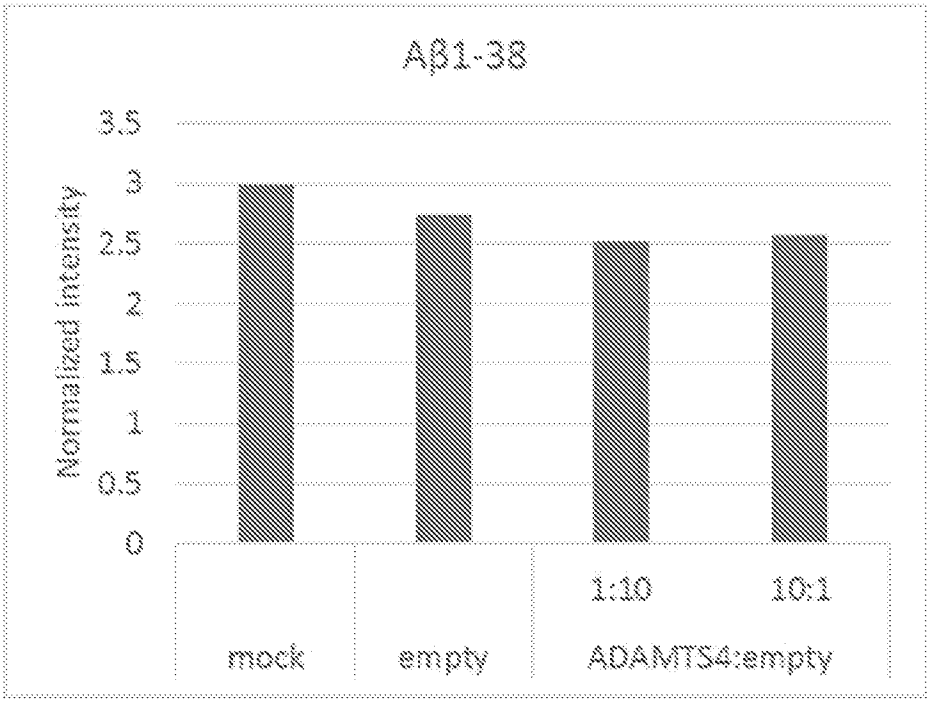
[図8]


APP669-709
Normalized intensity
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
mock
empty
1:10
10:1
ADAMTS4:empty

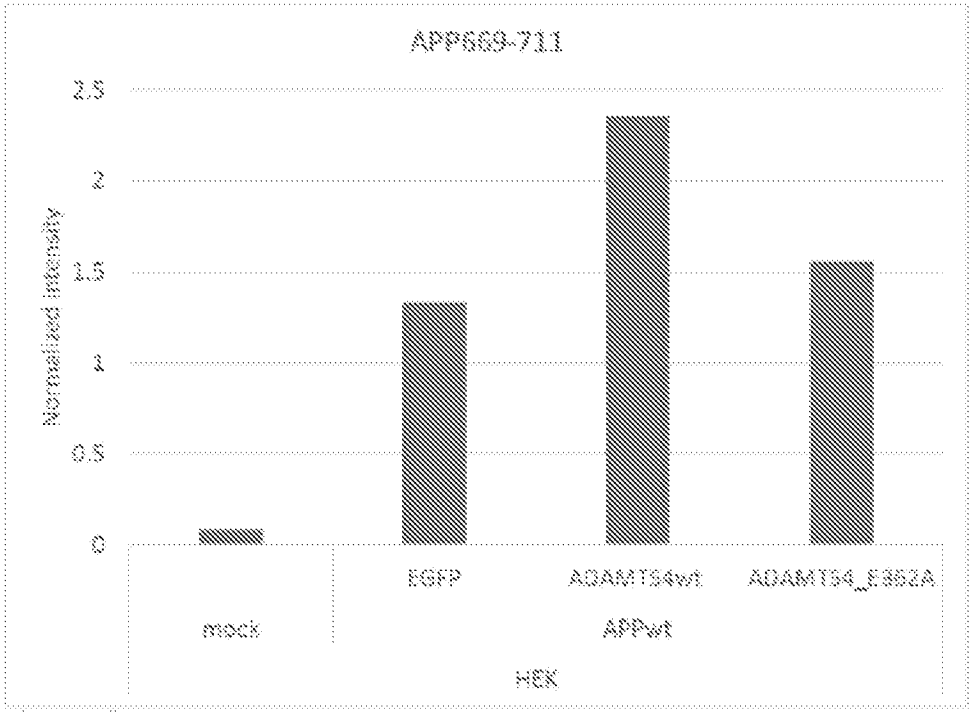
[図9]


Aβ1-40
Normalized intensity
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
mock
empty
1:10
10:1
ADAMTS4:empty

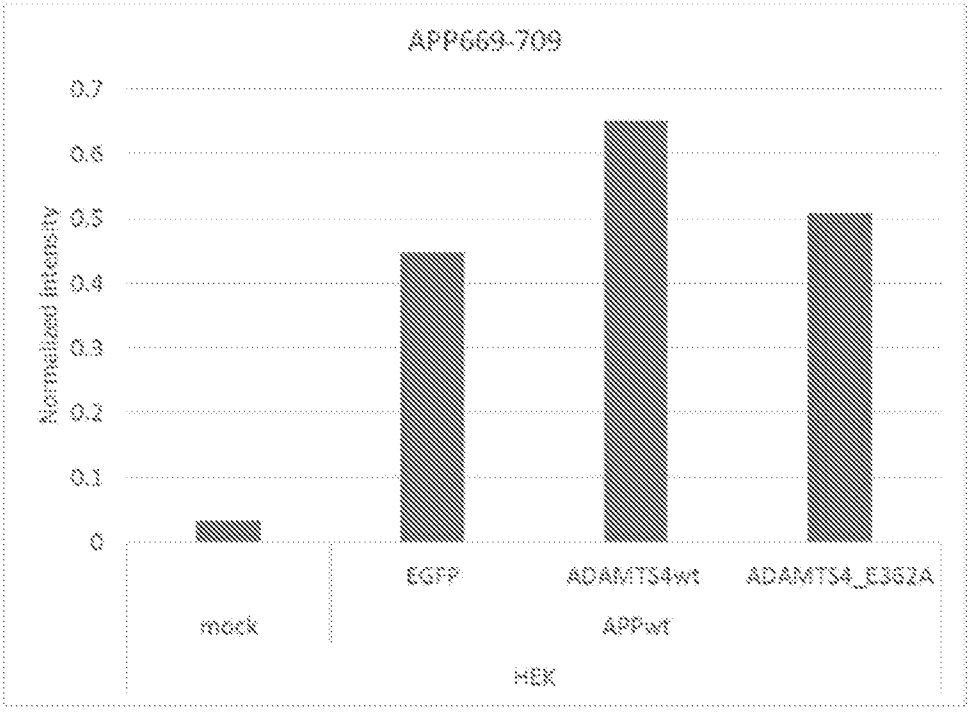
[図10]


Aβ1-38
Normalized intensity
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
mock
empty
1:10
10:1
ADAMTS4:empty

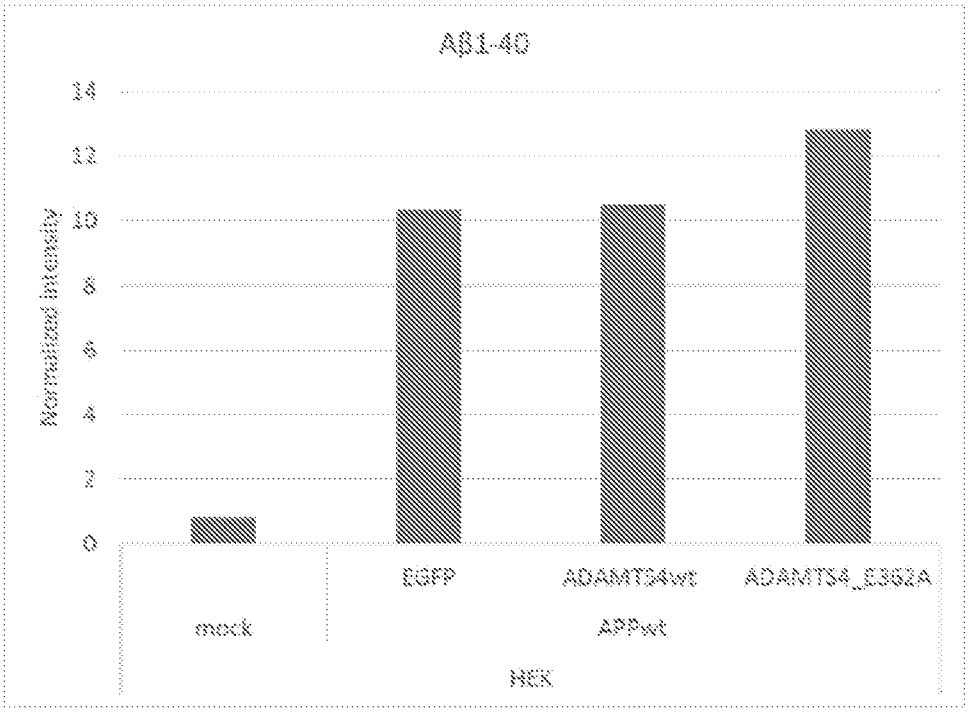
[図11]


APP669-711
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Normalized intensity
EGFP
ADAMTS4wt
ADAMTS4_E362A
mock
APPwt
HEK

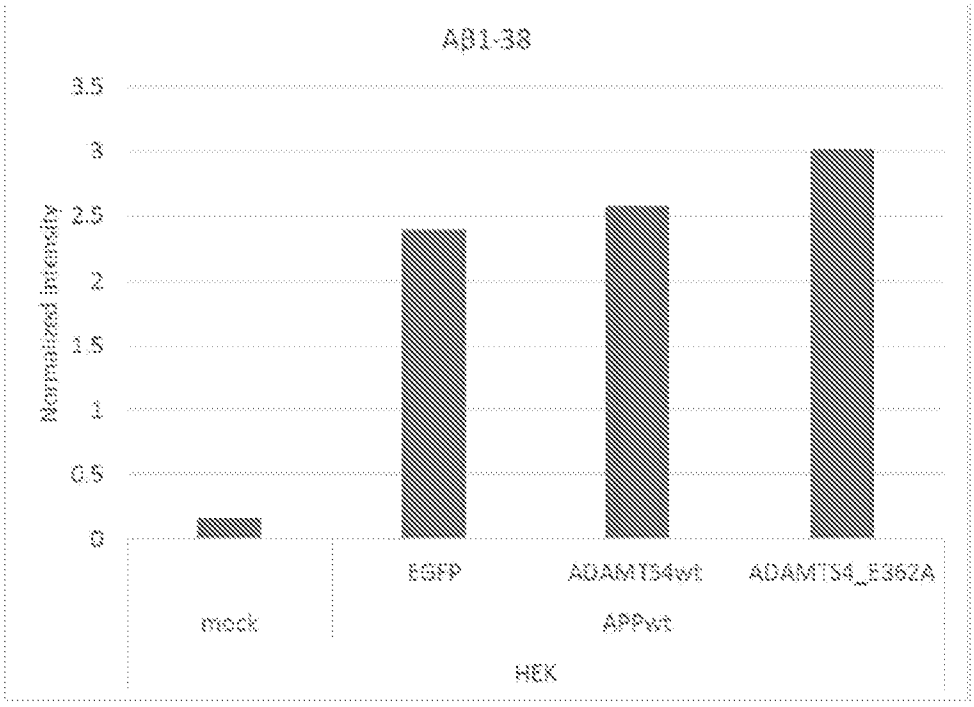
[図12]


APP669-709
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Normalized intensity
EGFP
ADAMTS4wt
ADAMTS4_E362A
mock
APPwt
HEK

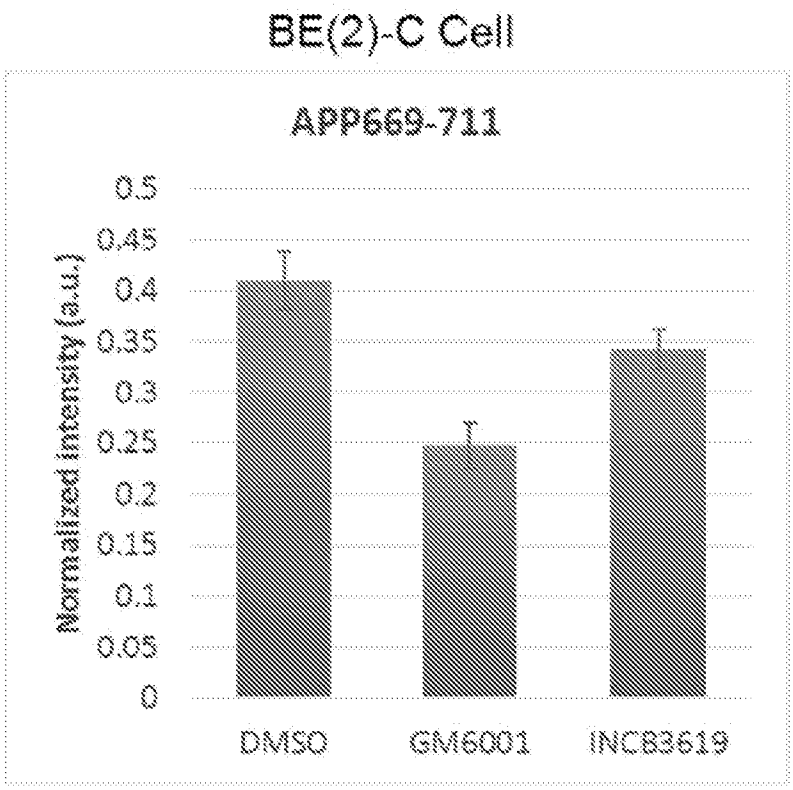
[図13]


Aβ1-40
Normalized intensity
14
12
10
8
6
4
2
0
EGFP
ADAMTS4wt
ADAMTS4_E362A
mock
APPwt
HEK

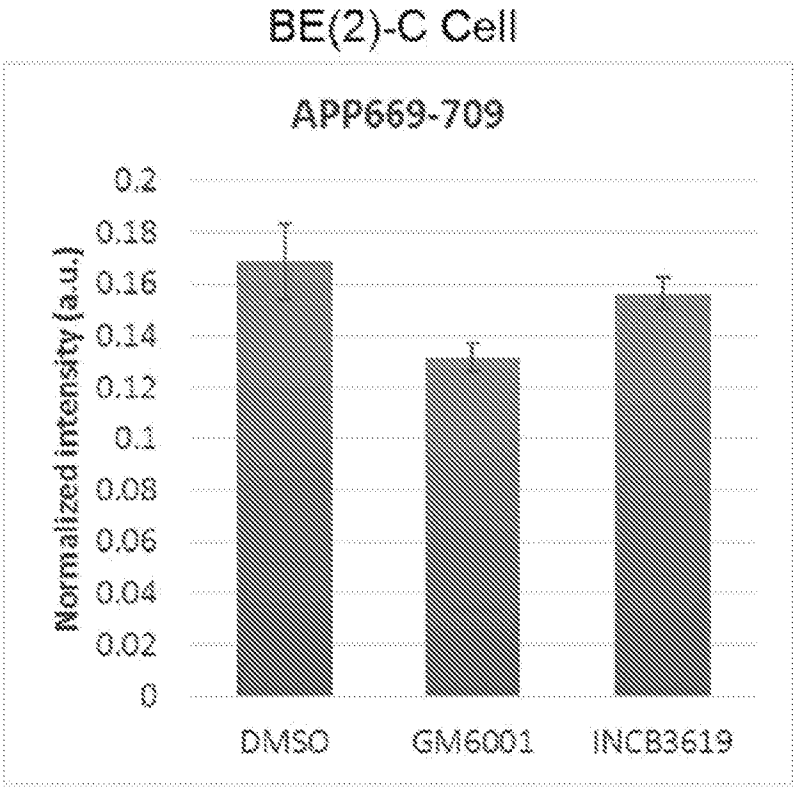
[図14]


Aβ1-38
Normalized intensity
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
EGFP
ADAMTS4wt
ADAMTS4_E362A
mock
APPwt
HEK

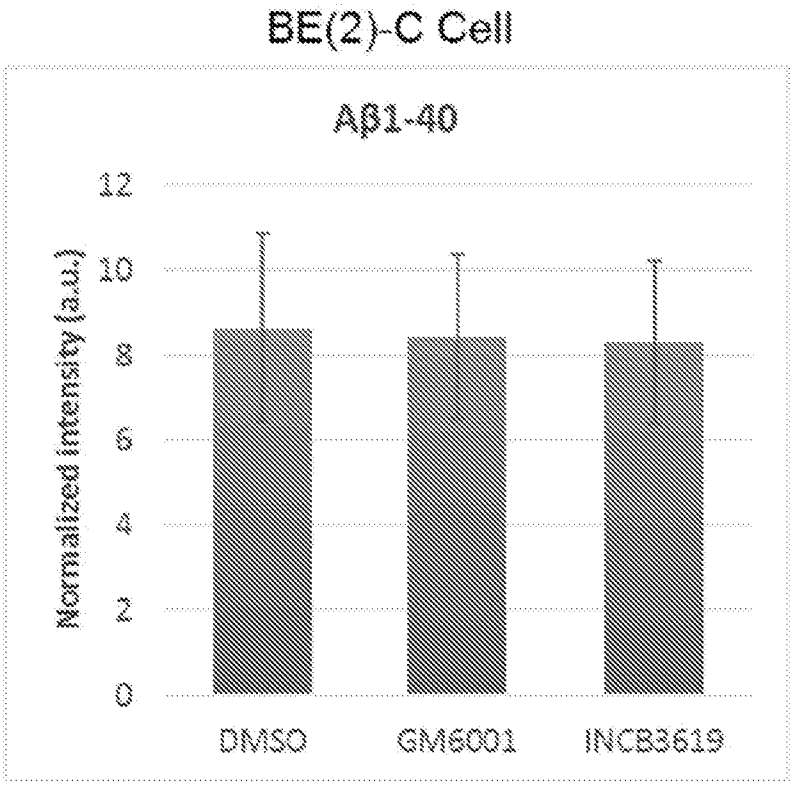
[図15]


BE(2)-C Cell
APP669-711
Normalized intensity (a.u.)
0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
DMSO
GM6001
INCB3619

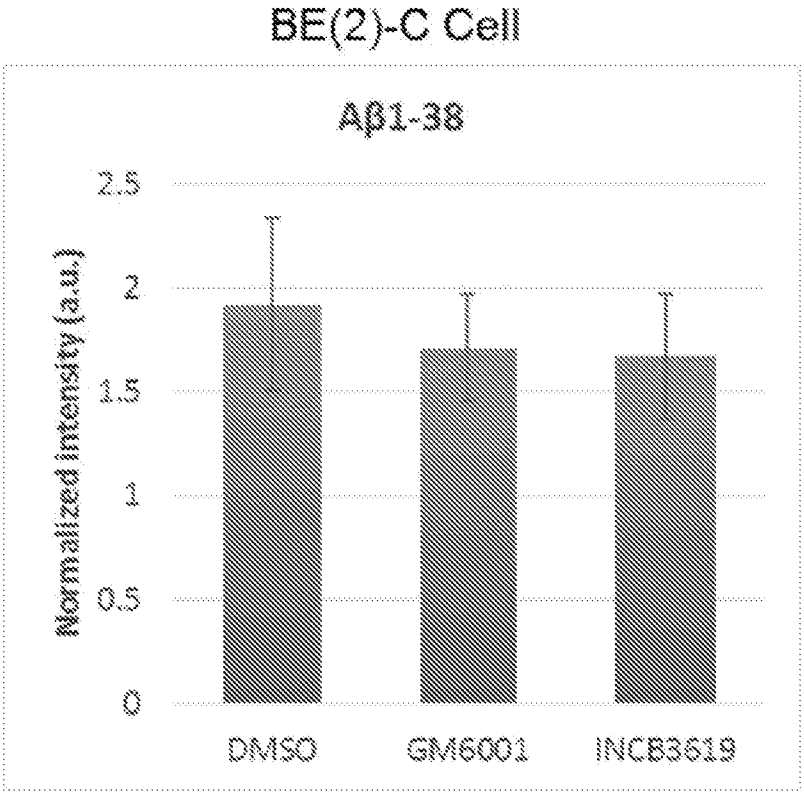
[図16]


BE(2)-C Cell
APP669-709
Normalized intensity (a.u.)
0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
DMSO
GM6001
INCB3619

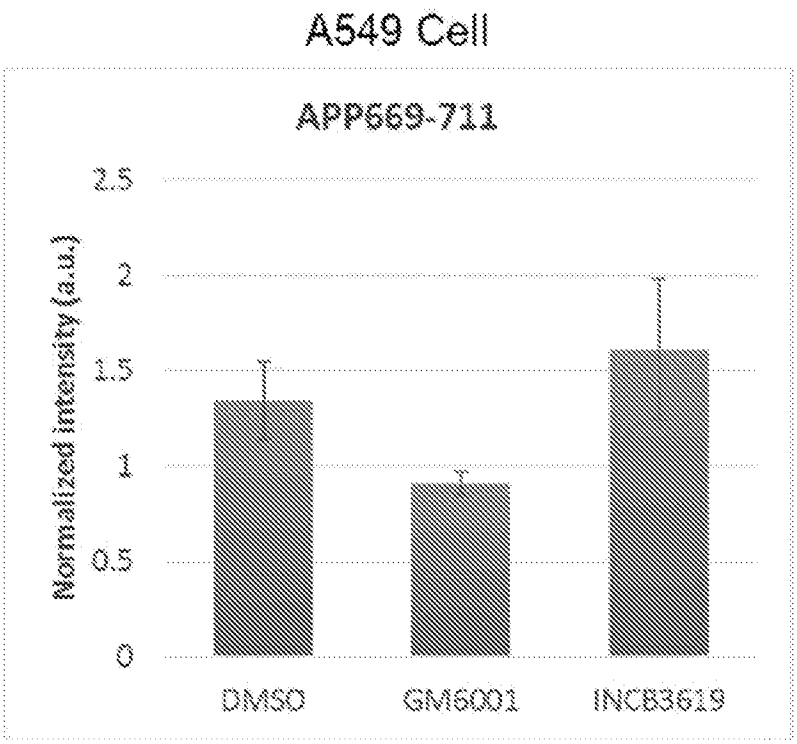
[図17]


BE(2)-C Cell
Aβ1-40
Normalized intensity (a.u.)
12
10
8
6
4
2
0
DMSO
GM6001
INCB3619

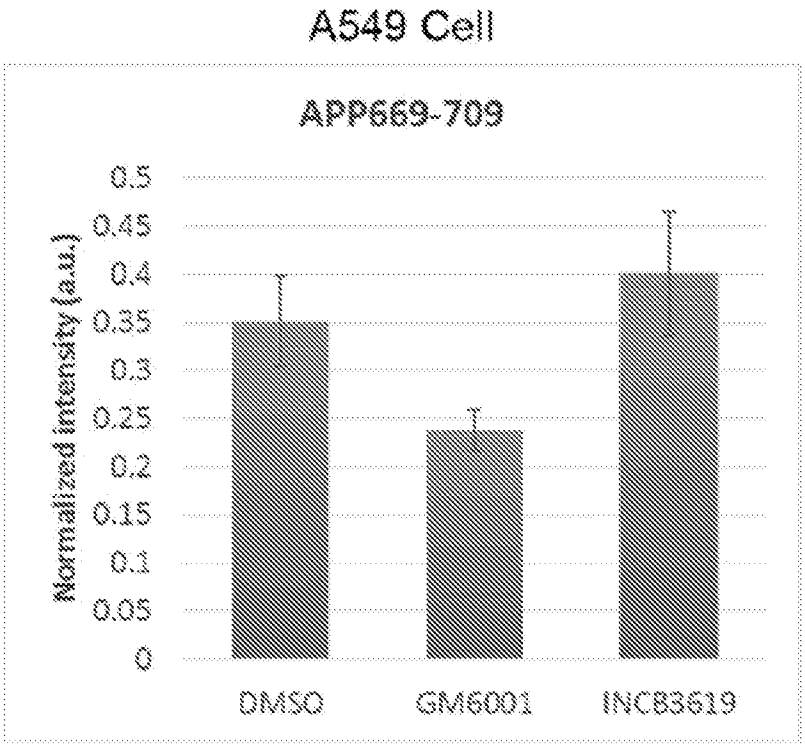
[図18]


BE(2)-C Cell
Aβ1-38
Normalized intensity (a.u.)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
DMSO
GM6001
INCB3619

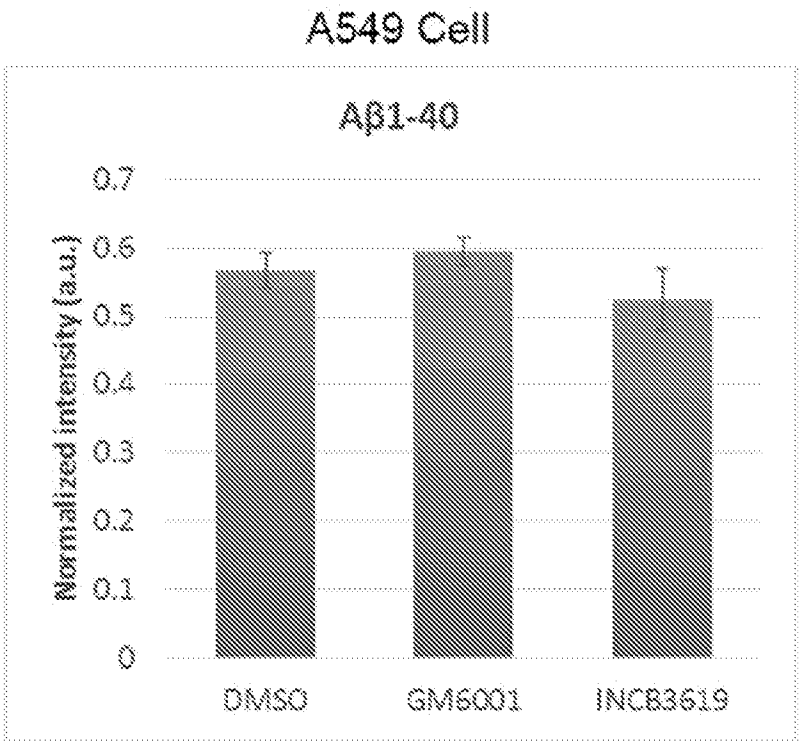
[図19]


A549 Cell
APP669-711
Normalized intensity (a.u.)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
DMSO
GM6001
INCB3619

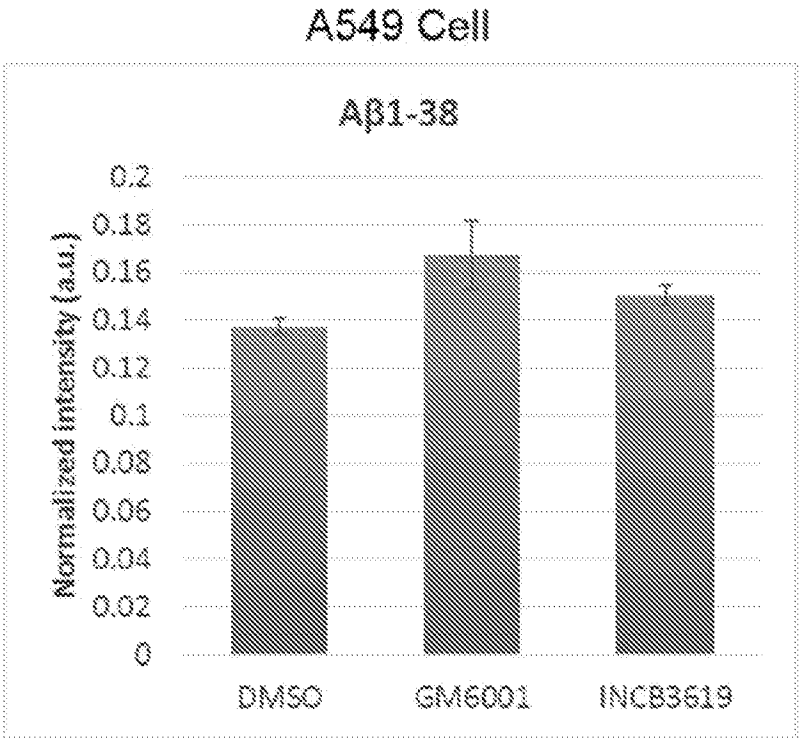
[図20]


A549 Cell
APP669-709
Normalized intensity (a.u.)
0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
DMSO
GM6001
INCB3619

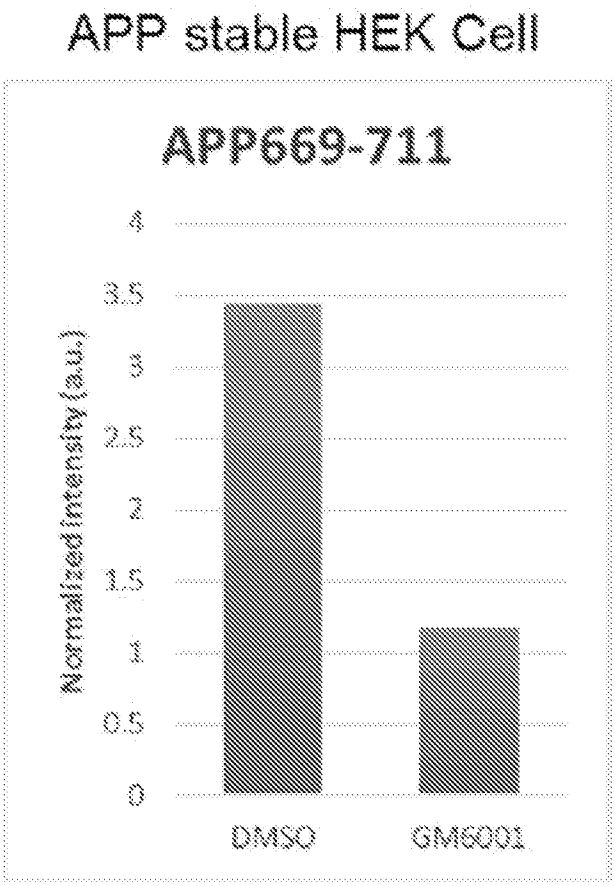
[図21]


A549 Cell
Aβ1-40
Normalized intensity (a.u.)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
DMSO
GM6001
INCB3619

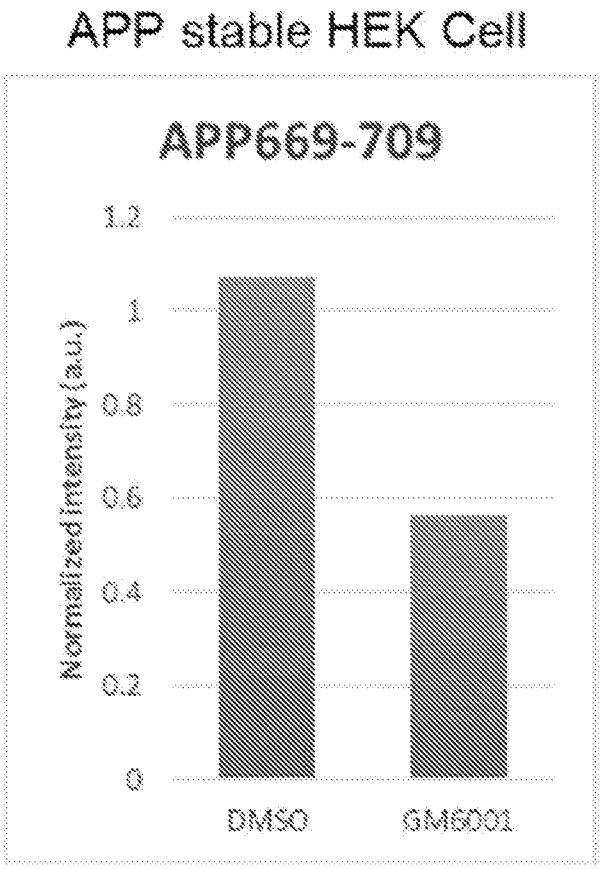
[図22]


A549 Cell
Aβ1-38
Normalized intensity (a.u.)
0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
DMSO
GM6001
INCB3619

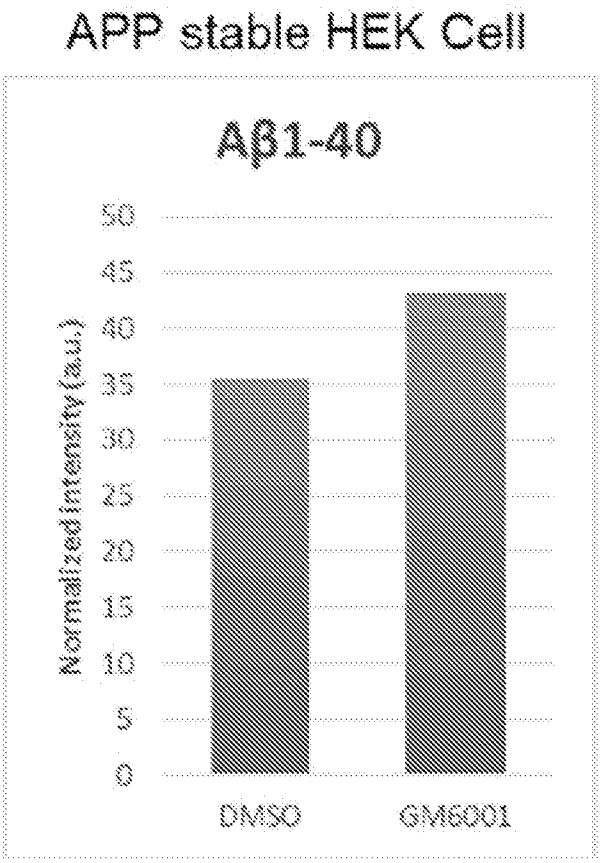
[図23]


APP stable HEK Cell
APP669-711
Normalized intensity (a.u.)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
DMSO
GM6001

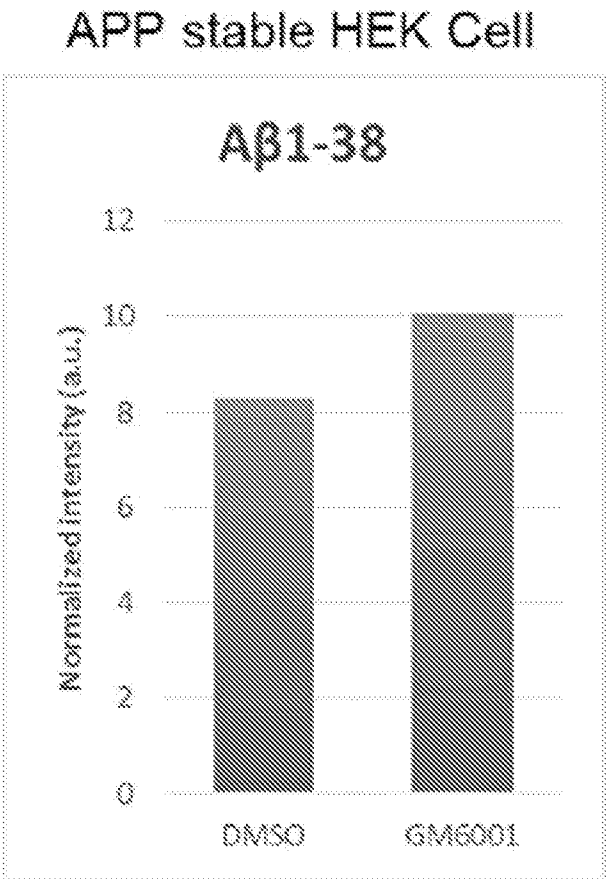
[図24]


APP stable HEK Cell
APP669-709
Normalized intensity (a.u.)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
DMSO
GM6001

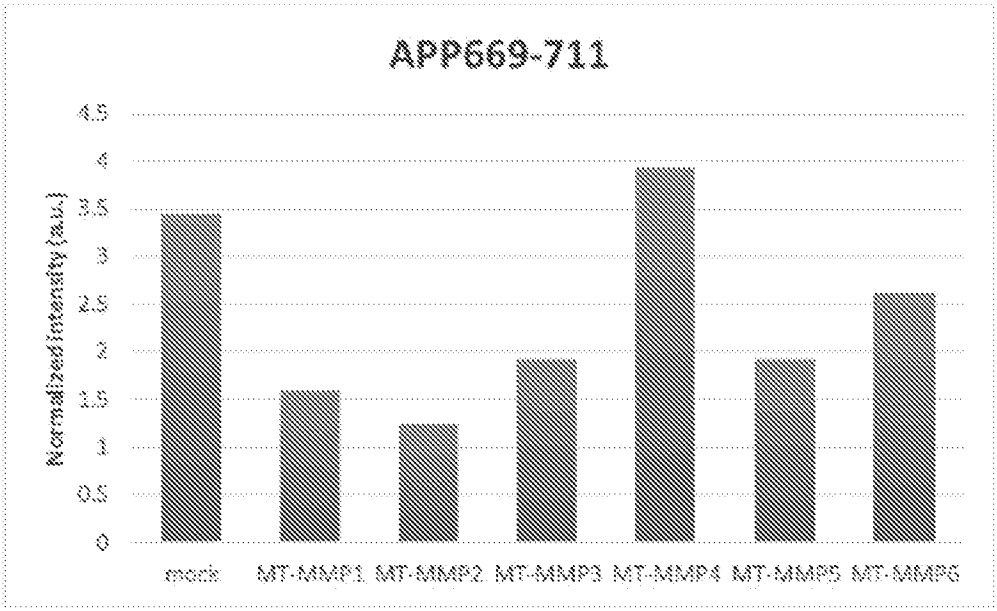
[図25]


APP stable HEK Cell
Aβ1-40
Normalized intensity (a.u.)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
DMSO
GM6001

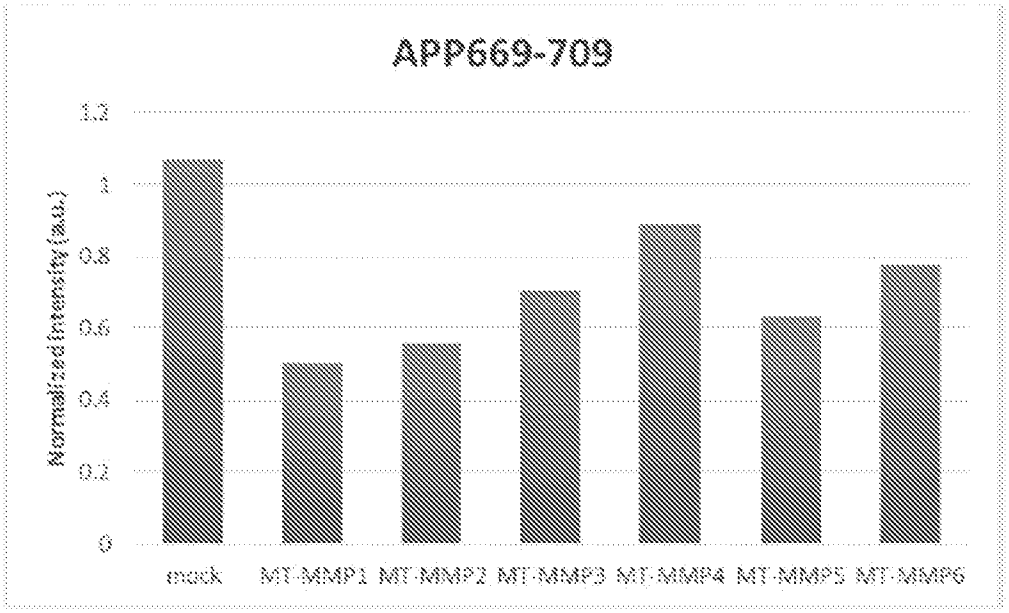
[図26]


APP stable HEK Cell
Aβ1-38
Normalized intensity (a.u.)
12
10
8
6
4
2
0
DMSO
GM6001

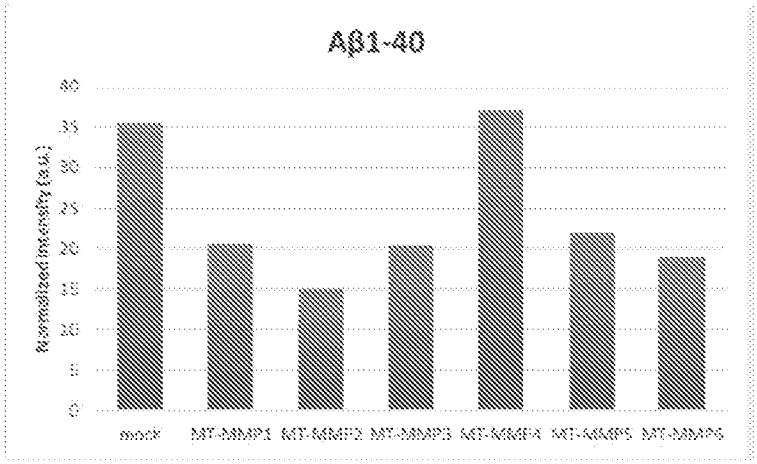
[図27]


APP669-711
Normalized intensity (a.u.)
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
mock
MT-MMP1
MT-MMP2
MT-MMP3
MT-MMP4
MT-MMP5
MT-MMP6

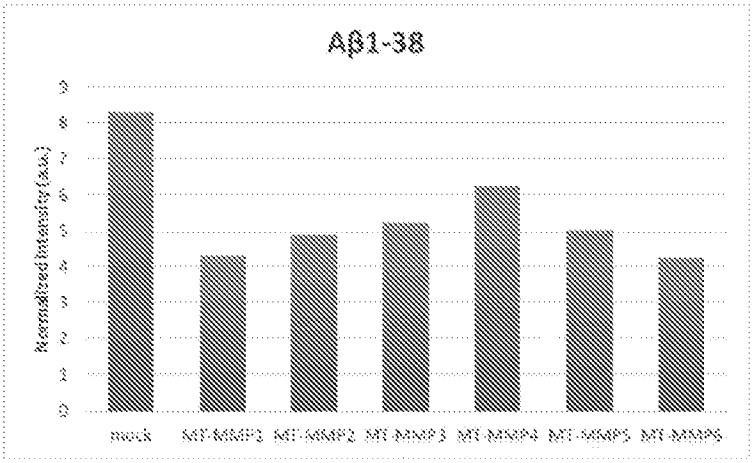
[図28]


APP669-709
Normalized intensity (a.u.)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
mock
MT-MMP1
MT-MMP2
MT-MMP3
MT-MMP4
MT-MMP5
MT-MMP6

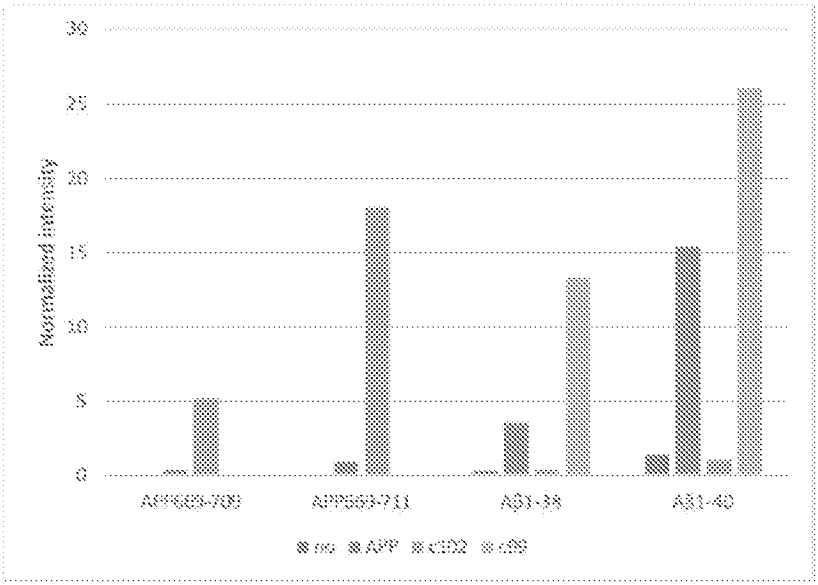
[図29]


Aβ1-40
Normalized intensity (a.u.)
mock
MT-MMP1
MT-MMP2
MT-MMP3
MT-MMP4
MT-MMP5
MT-MMP6

[図30]


Aβ1-38
Normalized intensity (a.u.)
mock
MT-MMP1
MT-MMP2
MT-MMP3
MT-MMP4
MT-MMP5
MT-MMP6

[図31]


Normalized intensity
APPβ28-708
APPβ593-711
Aβ1-38
Aβ1-40
mock
APP
cD2
cD9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/014433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N15/12(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/37(2006.01)i, C12Q1/68(2018.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i
FI: C12N15/12ZNA, C12N15/09110, C12Q1/02, C12Q1/68, C12Q1/37, G01N33/50Z, G01N33/15Z
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)
Int.Cl. C12N15/00-15/90, C12Q1/00-3/00, G01N33/00-33/98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII);
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/0305314 A1 (BEHER, D. et al) 10.12.2009 (2009-12-10), claims, paragraphs [0005], [0006]	1-12
Y	WO 2005/108949 A2 (GALAPAGOS GENOMICS N. V. et al) 17.11.2005 (2005-11-17), claims, page 11, line 19 to page 12, line 23	1-12
Y	NAKAMURA, A. et al, High performance plasma amyloid-β biomarkers for Alzheimer's disease, NATURE, 2018, vol. 554, pp. 249-254, abstract, fig. 1, 2	1-12
Y	WO 2015/178398 A1 (SHIMADZU CORPORATION) 26.11.2015 (2015-11-26), claims	1-12
Y	WO 2017/047529 A1 (SHIMADZU CORPORATION) 23.03.2017 (2017-03-23), claims	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23.04.2020	16.06.2020
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

US 2009/0305314 A1	10.12.2009	(Family: none)
WO 2005/108949 A2	17.11.2005	(Family: none)
WO 2015/178398 A1	26.11.2015	US 2017/0184573 A1 claims EP 3147668 A1
WO 2017/047529 A1	23.03.2017	US 2018/0238909 A1 claims EP 3351939 A1

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/014433

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; C12Q 1/37(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i
FI: C12N15/12 ZNA; C12N15/09 110; C12Q1/02; C12Q1/68; C12Q1/37; G01N33/50 Z; G01N33/15 Z

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））

C12N15/00-15/90; C12Q1/00-3/00; G01N33/00-33/98

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	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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
Y	US 2009/0305314 A1 (BEHER, D. et al) 10.12.2009 (2009-12-10) Claims, [0005], [0006]	1-12
Y	WO 2005/108949 A2 (GALAPAGOS GENOMICS N. V. et al) 17.11.2005 (2005-11-17) Claims, 第１１頁第１９行～第１２頁第２３行	1-12
Y	NAKAMURA, A. et al, High performance plasma amyloid-β biomarkers for Alzheimer's disease, NATURE, 2018, Vol.554, pp.249-254 Abstract, Figure 1, 2	1-12
Y	WO 2015/178398 A1 (株式会社島津製作所) 26.11.2015 (2015-11-26) 特許請求の範囲	1-12
Y	WO 2017/047529 A1 (株式会社島津製作所) 23.03.2017 (2017-03-23) 特許請求の範囲	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ 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の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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
23.04.2020	16.06.2020

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
松本　淳 4B 4675

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/014433

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2009/0305314 A1	10.12.2009	（ファミリーなし）	
WO 2005/108949 A2	17.11.2005	（ファミリーなし）	
WO 2015/178398 A1	26.11.2015	US 2017/0184573 A1 Claims EP 3147668 A1	
WO 2017/047529 A1	23.03.2017	US 2018/0238909 A1 Claims EP 3351939 A1	