

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-520367

(P2018-520367A)

(43) 公表日 平成30年7月26日(2018.7.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/50 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/50	Z N A Z 2 G O 4 5
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2018.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	Z
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-507760 (P2018-507760)  
 (86) (22) 出願日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年12月25日 (2017. 12. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2015/078070  
 (87) 国際公開番号 WO2016/172955  
 (87) 国際公開日 平成28年11月3日 (2016. 11. 3)

(71) 出願人 517381234  
 ジャンスー・ヌオーペータ・ファーマシュー  
 ーティカル・テクノロジー・カンパニー・  
 リミテッド  
 中華人民共和国226499ジャンスー、  
 ナントン、ルドン・カウンティ、ルドン・  
 ハイテク・インダストリアル・ディベ  
 ロップメント・ゾーン、イノベーション・  
 パーク  
 (74) 代理人 100100158  
 弁理士 鮫島 睦  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史  
 (74) 代理人 100157956  
 弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の治療に用いられる薬物および治療標的のスクリーニング方法

(57) 【要約】

PI4KIII タンパク質、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B膜タンパク質、該タンパク質によって形成されるTTC7タンパク質および膜タンパク質複合体、または関連する酵素活性の量を阻害およびダウンレギュレートして、神経細胞によるA 分泌を促進し、ニューロン内でのA 蓄積を減少させ、それによりADモデルのミバエやマウスの神経機能障害を減少させるための遺伝的手段または関連阻害剤の使用が開示される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞からのA<sub>42</sub>分泌を増加させることができる医薬および治療標的をスクリーニングすることを含む、アルツハイマー病を治療するための医薬および治療標的のスクリーニング方法。

## 【請求項 2】

アルツハイマー病を治療するための医薬および治療標的のスクリーニング方法であって、以下のステップを含む方法：

1)分泌シグナルペプチドに融合したAPPまたはA を過剰発現する培養細胞またはショウジョウバエ組織に、薬物を適用すること、または分泌シグナルペプチドに融合したAPPまたはA を過剰発現する培養細胞またはショウジョウバエ組織中で治療標的を調節するステップ；

および

2)分泌シグナルペプチドに融合したAPPまたはA を過剰発現する培養細胞またはショウジョウバエ組織からのA 分泌を検出するためのイムノアッセイ法を用いるステップ；ここで、医薬または治療標的の調節の発明が、細胞からのA 分泌を増加させる場合には、該薬剤または治療標的を用いてアルツハイマー病を治療することができる。

## 【請求項 3】

A が、A<sub>42</sub>である、請求項 1 または 2 に記載のアルツハイマー病を治療するための医薬および治療標的のスクリーニング方法。

## 【請求項 4】

A 分泌を検出するためのイムノアッセイ法が、酵素結合イムノソルベントアッセイまたは電気化学発光アッセイである、請求項 2 に記載のアルツハイマー病を治療するための医薬および治療標的のスクリーニング方法。

## 【請求項 5】

APPを過剰発現するか、または分泌シグナルペプチドを含む培養細胞が、ヒト由来のAPPで安定にトランスフェクトされたHEK293、N2aまたはSH-SY5Y細胞株である、請求項 2 に記載のアルツハイマー病を治療するための医薬および治療標的のスクリーニング方法。

## 【請求項 6】

分泌シグナルペプチドに融合したAPPまたはA を過剰発現するショウジョウバエ組織が、ショウジョウバエ第3齢幼虫組織である、請求項 2 に記載のアルツハイマー病を治療するための医薬および治療標的のスクリーニング方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

資金援助研究に関する陳述

本発明は、これまで、中国の973の科学技術省プログラム(許可番号2013CB530900)および国家自然科学基金財団(許可番号81371400および81071026)によって支持されてきた。

技術分野

本発明は、特に、アルツハイマー病を治療するためにRBF/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質とTTC7タンパク質とで形成されたPI4KIII キナーゼおよびその膜タンパク質複合体を関連する阻害剤を用いてダウンレギュレーションする方法に関する。別の局面において、本発明は、細胞からのA 分泌が促進されるか否かに応じて、アルツハイマー病の治療のための医薬および治療標的をスクリーニングする方法に関する。別の態様では、本発明は、細胞からのA 分泌が促進されるか否かに応じて、アルツハイマー病の治療のための医薬および治療標的をスクリーニングする方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

アルツハイマー病(AD)は、高齢者における最も一般的な神経変性疾患であり、学習および記憶能力の進行性喪失を特徴とする。シナプスの機能不全および喪失は、ADの初期段

10

20

30

40

50

階で起こるが、A<sub>42</sub>（特にA<sub>42</sub>）の蓄積が、重要な役割を果たすADの学習および記憶機能不全の主要な細胞機構として広く認識されている。1つの可能な説明は、これらの医薬または治療法が、ADの学習および記憶障害を引き起こす重要な病因を変えられなかったことである。ADにおけるA<sub>42</sub>蓄積のすべての形態において、より深い理解が必要である。

#### 【0003】

A<sub>42</sub>は、細胞外空間に蓄積するだけでなく、ニューロンにも蓄積する。増加していく証拠は、A<sub>42</sub>がニューロン中の種々の細胞内器官に蓄積し、シナプス欠損、アミロイド斑形成、ニューロン死等のAD病因変化に関与することを示唆している。さらに、シナプスおよび認知機能に対して最も有害な効果であると考えられるオリゴマーA<sub>42</sub>は、細胞内で形成され、AD患者およびAPPトランスジェニックマウスの脳ニューロンまたは細胞膜に蓄積する。このような膜結合型A<sub>42</sub>は、ニューロンの細胞膜または細胞内器官の膜に存在し得る。たとえば細胞外A<sub>42</sub>のエンドサイトーシス、オートファゴソームに減少した細胞内で生成されたA<sub>42</sub>の分泌の低下、オートファゴソーム中のA<sub>42</sub>産生および蓄積、および細胞内A<sub>42</sub>分解の低下などのニューロンA<sub>42</sub>蓄積をもたらす可能性がある。

10

#### 【0004】

A<sub>42</sub>は、細胞内および細胞外に蓄積するが、AD患者または初期AD患者の脳脊髄液(CSF)中のA<sub>42</sub>濃度は対照集団の約半分まで減少する。ADモデルマウスでは、脳脊髄液および脳間質液(ISF)中のA<sub>42</sub>濃度は日齢依存的低下を示すが、ISFではA<sub>42</sub>二量体は検出されない。CSF中のA<sub>42</sub>濃度の減少は、細胞外アミロイド斑の金属イオン封鎖効果、A<sub>42</sub>分泌の低下、ニューロンまたは脳細胞膜中のA<sub>42</sub>蓄積によっておそらく引き起こされると推定される。

20

#### 【0005】

研究は、リン脂質およびそれらの代謝酵素が：

1) A<sub>42</sub>が、脂質膜に挿入され、酸性リン脂質に結合し、A<sub>42</sub>中のランダムコイルの構造への変換を誘発し、膜内または膜上のA<sub>42</sub>凝集を導くこと；

2) 血漿ホスファチジルイノシトール-4,5-リン酸(PIP<sub>2</sub>)レベルが、培養細胞からのA<sub>42</sub>分泌を逆相関させること；

3) A<sub>42</sub>の発現が、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)の阻害によって救済することができる八エのニューロンの機能不全および学習および記憶機能不全を誘発すること；

30

などのA<sub>42</sub>とのその相互作用またはAD関連変化への関与を介する種々の細胞および分子プロセスを介してAD病因に寄与し得ることを実証している。

#### 【0006】

ショウジョウバエでは、ローリングブラックアウト(rbo)遺伝子は、ジアシルグリセロールリアーゼと一定の相同性を有する細胞膜タンパク質RBOをコードする。RBOタンパク質は、ショウジョウバエのリン脂質代謝、光形質導入、シナプス伝達およびバルクエンドサイトーシスにおいて機能する。RBOタンパク質は、酵母からヒトまで保存的である。酵母(EFR3)およびマウス(EFR3AおよびEFR3B)のRBOの同族体は、PI4KIIIを細胞膜上に固定し、ホスファチジルイノシトール4-リン酸(PI<sub>4</sub>P)およびPIP<sub>2</sub>レベルの血漿レベルを調節するように、ホスファチジルイノシトール4-キナーゼIII(PI4KIII)および細胞膜上の足場タンパク質と複合体を形成する(Tetratricopeptide repeat domain 7、TTC7と呼ばれる、Baird D、Stefan Cら、2008、J Cell Biol; Nakatsu F、Baskin JFら、2012、J Cell Biol)。

40

#### 【0007】

ショウジョウバエでは、分泌シグナルペプチドと融合した汎ニューロン発現A<sub>42</sub>は、ニューロン内A<sub>42</sub>蓄積および神経欠損を誘導する。本発明者らは、単純な神経経路であるショウジョウバエ巨大繊維(GF)経路における分泌シグナルペプチドを含むA<sub>42</sub>の発現が、ニューロン内A<sub>42</sub>蓄積および日齢依存性シナプス不全および運動能力欠損を引き起こすことをこれまでに明らかにしている。A<sub>42</sub>を発現するそのようなショウジョウバエは、ニューロン内A<sub>42</sub>蓄積および関連するシナプス欠損における候補遺伝子の役割を試験す

50

るための便利なプラットフォームを提供する。これを念頭において、本発明者らは、このモデルにおいて、遺伝子 *rbo*、PI4KIII、および *ttc7*、ならびに共通のPI4KIII タンパク質阻害剤が神経変性疾患に及ぼす変異または過剰発現の効果を試験した。本発明者らは、海馬ニューロンの萎縮におけるEfr3a(*rbo*遺伝子のマウスホモログ)ノックダウンの効果、および学習と記憶によく用いられるPI4KIII の阻害剤である低分子阻害剤フェニルアルシンオキシド(PAO)の効果、CSFおよび脳実質膜におけるA<sub>42</sub>のレベル、ならびにPI4KA遺伝子(PI4KIII タンパク質をコードする)の学習および記憶におけるダウンレギュレーションの効果、およびリポソーム中のA<sub>42</sub>のオリゴマー形成におけるPI4KIII 生成物PI<sub>4</sub>Pの効果を実験した。APP/PS1トランスジェニックマウスにおいてさらに検討した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

発明の概略

本発明は、ショウジョウバエおよびマウスADモデルにおける神経欠損を改善するために、遺伝的手段または関連する阻害剤を用いて、PI4KIII タンパク質、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質、TTC7タンパク質、およびそれらの膜タンパク質複合体の量または関連酵素の活性のダウンレギュレーションが、ニューロン細胞のA<sub>42</sub> (特にA<sub>42</sub>)分泌を促進し、それに対応して、ニューロン内A<sub>42</sub>蓄積を減少させることができることを開示する。したがって、本発明は、AD治療におけるニューロンA<sub>42</sub>分泌の本質的役割を明らかにし、AD治療のための新規戦略を提供する；一方、本発明は、ADを治療するための新規な医薬を提供し、ADの治療のための医薬および治療標的のスクリーニングの新たな方向性を指摘する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

1つの態様では、本発明は、細胞からのA<sub>42</sub>分泌を増加させることができる医薬および治療標的をスクリーニングすることを含む、ADを治療するための医薬および治療標的のスクリーニング方法を提供する。

【0010】

本発明の1つの特定の実施態様によれば、ADを治療するための医薬および治療標的のスクリーニング方法は、以下のステップを含む：

1)分泌シグナルペプチドに融合したAPPまたはA<sub>42</sub>を過剰発現する培養細胞またはショウジョウバエ組織に、該薬物を適用すること、または分泌シグナルペプチドに融合したAPPまたはA<sub>42</sub>を過剰発現する培養細胞またはショウジョウバエ組織中で該治療標的を調節するステップ；

および

2)分泌シグナルペプチドに融合したAPPまたはA<sub>42</sub>を過剰発現する培養細胞またはショウジョウバエ組織からのA<sub>42</sub>分泌を検出するためのイムノアッセイ法を用いるステップ；ここで、医薬または治療標的の調節の発明が、細胞からのA<sub>42</sub>分泌を増加させるが、A<sub>42</sub>産生の増加を伴わない場合には、該薬剤または治療標的を用いてアルツハイマー病を治療することができる。好ましくは、アルツハイマー病を治療するための医薬および治療標的のスクリーニング方法において、前記A<sub>42</sub>はA<sub>42</sub>であり；A<sub>42</sub>分泌を検出するための前記イムノアッセイ法は、酵素結合イムノソルベントアッセイまたは電気化学発光アッセイであり；分泌シグナルペプチドに融合したAPPまたはA<sub>42</sub>を過剰発現する前記培養細胞は、ヒト由来のAPPで安定にトランスフェクトされたHEK293、N2aまたはSH-SY5Y細胞であり；あるいは、分泌シグナルペプチドに融合したAPPまたはA<sub>42</sub>を過剰発現する前記ショウジョウバエ組織は、ショウジョウバエ第3齢幼虫組織である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】*rbo*遺伝子突然変異は、A<sub>arc</sub>発現(A<sub>arc</sub>:A<sub>42</sub>の北極型突然変異)八工における神経欠損を改善し、PI4KIII タンパク質発現レベルを低下させるか、またはPI4KIII

10

20

30

40

50

タンパク質とRBOタンパク質との相互作用を弱める。

【図2】PI4KIII タンパク質発現レベルのダウンレギュレーションまたは薬学的阻害は、 $A_{arc}$ 発現ハエの神経欠損を改善する。

【図3】RBO/PI4KIII タンパク質の発現レベルまたは機能のダウンレギュレーションは、ニューロン内 $A_{arc}$ 蓄積を減少させる。

【図4】RBO/PI4KIII タンパク質の発現レベルまたは機能のダウンレギュレーションは、 $A_{42}$ 分泌を促進する。

【図5】APP/PS1マウスおよび対照マウスにおける海馬CA3およびDG領域におけるニューロンの樹状突起直径および棘密度におけるEfr3a遺伝子ノックダウンの効果。

【図6】APP/PS1マウスおよび対照マウスにおける、学習および記憶、CSFおよび脳膜関連 $A_{42}$ レベルにおけるPAO処置の効果。

【図7】rbo遺伝子突然変異は、 $A_{arc}$ 発現ハエの神経欠損を改善する。

【図8】rboおよびshibire遺伝子突然変異が $A_{arc}$ またはショウジョウバエタウをそれぞれ過剰発現するハエの運動能力および寿命に及ぼす効果。

【図9】 $A_{arc}$ 発現ハエにおけるrbo<sup>S358A</sup>およびitpr<sup>SV35</sup>遺伝子突然変異の効果。

【図10】N2a細胞の細胞外 $A_{42}$ のエンドサイトーシスにおけるEfr3a遺伝子ノックダウンの効果、および $A_{arc}$ 発現ハエの $A_{arc}$ 転写におけるrboおよびPI4KA遺伝子変異の効果。

【図11】マウスのHEK293細胞または初代海馬ニューロンにおけるEfr3aまたはPI4KA遺伝子ノックダウンの効率。

【図12】APP/PS1マウスのPI4KA遺伝子(PI4KIII をコードする)の1コピーへのトランスポゾン挿入は、学習および記憶障害を有意に改善する。

【図13】PI<sub>4</sub>Pは、リポソーム中の $A_{42}$ のオリゴマー化を促進する。

【図14】APP発現レベルおよび、およびセクレターゼ活性におけるPAOの効果。

【図15】 $A_{arc}$ を発現するハエの神経欠損におけるttc7遺伝子突然変異および過剰発現の効果。

【発明を実施するための形態】

【0012】

詳細な記載

明細書および特許請求の範囲を含む本発明において、他に特定されない限り、以下の用語は以下の意味で用いられる：

【0013】

用語「rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b遺伝子」は、ショウジョウバエ由来のrbo遺伝子、酵母由来のEfr3遺伝子、または哺乳動物由来のEfr3a遺伝子およびEfr3b遺伝子を意味する；用語「RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質」は、ショウジョウバエ由来のrbo遺伝子、酵母由来のEfr3遺伝子、または哺乳動物由来のEfr3a/Efr3b遺伝子によってコードされるタンパク質を意味する。

【0014】

本明細書で使用される用語「PI4KIII /PI4KA遺伝子」は、ショウジョウバエまたは哺乳動物に由来するPI4KIII 遺伝子またはPI4KA遺伝子を意味する；本明細書で使用される用語「PI4KIII タンパク質」は、ショウジョウバエまたは哺乳動物におけるPI4KIII /PI4KA遺伝子によってコードされるタンパク質を意味する。

【0015】

本明細書で使用される用語「ttc7遺伝子」は、ショウジョウバエおよび哺乳動物に由来するttc7遺伝子を意味する；本明細書で使用される用語「TTC7タンパク質」は、上記ショウジョウバエおよび哺乳動物においてttc7によってコードされるタンパク質を意味する。

【0016】

本明細書で使用される用語「阻害剤」は、標的物体の量、特定の機能、および特定の特性を、低下させ、減少させ、または排除することができる材料を意味する。前記標的物体はタンパク質、ポリペプチド、核酸などであってもよく、前記阻害剤は、対象物の量、特定の機能、および特定の特性の対応する低下、減少、または排除をもたらすように、標的

10

20

30

40

50

物体の量、特定の機能、および特定の特性に直接的または間接的に影響を及ぼす。前記阻害剤は、タンパク質、ポリペプチド、核酸、低分子化合物などであり得る。

【0017】

たとえば、本明細書で使用される「PI4KIII 阻害剤」という用語は、PI4KIII / PI4KA遺伝子の発現、転写、翻訳および/またはそこから産生されるPI4KIII タンパク質の安定性、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質およびTTC7タンパク質への結合能、およびそのホスホキナーゼ活性などを低下させ、低減させまたは排除することができる物質を意味し、PI4KIII /PI4KAに特異的な阻害性ヌクレオチド、PI4KIII タンパク質に対する抗体、PI4KIII キナーゼ活性を阻害することができる低分子化合物阻害剤、および/またはPI4KIII タンパク質と他の膜タンパク質との間の相互作用を阻害することができる物質などが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0018】

同様に、本明細書で使用される「RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B阻害剤」という用語は、rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b遺伝子の発現、転写、翻訳および/またはそこから産生されるRBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質の安定性、PI4KIII タンパク質等への結合能を阻害し、低下させ、または排除することができる物質を意味し、rbo/Efr3/Efr3a/Efr3bに特異的な阻害性ヌクレオチド、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質に対する抗体、およびRBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質およびPI4KIII タンパク質の複合体の形成を阻害することができる物質などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0019】

本明細書で使用される「TTC7阻害剤」という用語は、ttc7遺伝子の発現、転写、翻訳および/またはそこから産生されるTTC7タンパク質の安定性およびRBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質等への結合能を低下させ、低減させ、または除去することができる物質を意味し、ttc7に特異的な阻害性ヌクレオチド、TTC7タンパク質に対する抗体、および/またはTTC7タンパク質と膜タンパク質RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bとの間の相互作用を阻害することができる物質などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0020】

上記と同様に、本明細書で使用される「PI<sub>4</sub>P阻害剤」という用語は、細胞膜上のPI<sub>4</sub>Pの量レベルを阻害し、低下させ、または除去することができる物質を意味し、PI<sub>4</sub>Pに対する抗体、およびPI<sub>4</sub>Pに特異的に結合することができるOSH2-PH2X融合タンパク質またはOSH2-2x-PH融合タンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0021】

本明細書で使用される用語「抗体」は、特定のエピトープに結合する任意の免疫グロブリンまたは完全分子およびその断片を意味する。該抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、および親抗体の抗原結合能力を保持する限り、インタクトな抗体の断片および/または部分が挙げられるが、これらに限定されない。本発明において、たとえば、「PI4KIII に対する抗体」は、PI4KIII タンパク質、またはその機能的変異体もしくは機能的フラグメントに特異的に結合し得るモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単鎖抗体および免疫学的活性断片またはその部分を意味する。本発明において、「PI4KIII 抗体」、「PI4KIII に対する抗体」、および「抗PI4KIII 抗体」等の用語は、互換的に用いられる。

40

【0022】

本発明において、「機能的変異体」は、そのアミノ酸配列中に1つ以上のアミノ酸修飾を有する本発明のタンパク質またはポリペプチドを意味する。修飾は、「保存的」修飾(置換されたアミノ酸が類似の構造または化学的性質を有する)または「非保存的」修飾であり得る;同様の修飾には、アミノ酸の付加または欠失またはその両方が含まれる。しかしながら、アミノ酸残基の修飾もアミノ酸の付加または欠失も、元のアミノ酸配列の生物学的または免疫学的活性および機能を部分的に変化させたり、損傷したりすることはない。本発明において、同様に、「機能的断片」は、それがその一部であるタンパク質またはポリペプチドと実質的に類似または同一の生物学的または免疫学的活性および機能を保持

50

する本発明のタンパク質またはポリペプチドの任意の部分(親タンパク質またはポリペプチド)を意味する。

【0023】

本明細書で使用される用語「阻害ヌクレオチド」は、特定の遺伝子に結合してその発現を阻害することができるヌクレオチド化合物を意味する。典型的な阻害ヌクレオチドとして、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせんDNA、RNAアプタマー、リボザイム、低分子干渉RNA(siRNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)およびマイクロRNAが挙げられるが、これらに限定されない。これらのヌクレオチド化合物は、他のヌクレオチド配列よりも高い親和性で前記特定の遺伝子に結合し、特定の遺伝子の発現を阻害する。

【0024】

本明細書で使用される用語「低分子化合物」は、天然または化学合成され得る分子量3kダルトン未満の有機化合物を意味する。本明細書で使用される用語「誘導體」は、親有機化合物と類似の構造およびそれらの機能における同様の効果を有する、1つ以上の化学反応によって親有機化合物を修飾することによって生成される化合物を意味する。本明細書で使用される用語「類縁体」は、親有機化合物を化学的に修飾することによって生成されないが、親有機化合物と構造が類似し、それらの機能において同様の効果を有する化合物を意味する。

【0025】

本明細書で使用される用語「アルツハイマー病」(AD)は、進行性学習および記憶機能障害を特徴とする加齢性神経変性疾患を意味する。中期および進行期のほとんどのAD患者は、神経細胞外ベータアミロイド斑、Tauタンパク質で形成された細胞内神経原線維変化、またはシナプスおよび神経細胞の喪失を有する。この疾患は、ヒトまたは動物(イヌなど)に存在し得る。

【0026】

本明細書で使用される用語「A<sub>38</sub>」は、アミロイド前駆体タンパク質(APP)のセクレターゼ切断によって生成される38~48アミノ酸の長さを有する一連のポリペプチドを意味し、同じアミノ酸配列を有するポリペプチドA<sub>38</sub>、A<sub>40</sub>、A<sub>42</sub>、A<sub>44</sub>、A<sub>45</sub>などが挙げられる。本発明では、A<sub>38</sub>はまた、トランスジェニック法により発現されるA<sub>38</sub>融合タンパク質の他のタンパク質切断酵素を切断することにより、または特定の発現系によりウイルスベクターで細胞を感染させることによって生成されるものであり、たとえば、A<sub>38</sub>は、そのN-末端を介して、ショウジョウバエの壊死遺伝子(アミノ酸配列: MASKVSI LLLL TVHLLAAQTFAQDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVIA)(配列番号: 1)によってコードされるタンパク質に由来する分泌シグナルペプチド、またはラットプレプロエンケファリン(アミノ酸配列: MAQFLRLC I L L A L G S C L L A T V Q A)(配列番号: 2)等に由来する分泌型シグナルペプチドと融合タンパク質を形成し得る。

【0027】

本明細書で使用される「A<sub>38</sub>分泌」という用語は、細胞内A<sub>38</sub>蓄積を減少させることができる、細胞膜を介して細胞内または細胞膜上に生成されたA<sub>38</sub>の排出プロセスを意味する。ここで、「A<sub>42</sub>分泌」は、具体的には、細胞内A<sub>42</sub>蓄積を減少させることができる、細胞内または細胞膜を介して細胞膜上に生成されたA<sub>42</sub>の排出プロセスを意味する。

【0028】

本明細書で使用される用語「治療標的」は、特定の疾患を治療するために使用され得る様々な物質、および動物またはヒトの体内の物質の標的を意味する。前記疾患に対する治療効果は、前記物質が前記標的に作用するときに得られる。前記物質は、該物質が、遺伝子、タンパク質、タンパク質複合体、または疾患、症状、機能、相互作用関係に影響を与えて疾患を治療することができる限りは、タンパク質、ポリペプチド、核酸、低分子化合物などの様々な材料であり得、前記標的は、特定の遺伝子(遺伝子の特定配列を含む)、特定のタンパク質(タンパク質の特定部位を含む)、特定のタンパク質複合体(その特異的結合部位を含む)などの物質、あるいは特定の特性、特定の機能、前述の遺伝子および/またはタンパク質の周辺物質および環境との特定の相互作用関係などであり得る。

10

20

30

40

50

## 【0029】

本明細書で使用される用語「治療する」、「治療すること」、または「治療」は、その用語が適用される疾患の進行または疾患の1つ以上の症状の逆転、改善または阻害を意味する。本明細書で使用される場合、患者の状態に応じて、この用語はまた、疾患の予防またはそれに関連する任意の症状の発症を含む疾患の予防、および発症前の症状の改善または重症度の低下を含む。

## 【0030】

用語「阻害する」、「弱める」、「ダウンレギュレートする」、「除去する」などはすべて、量または程度の削減または減少を意味する。このような削減または減少は、このような傾向を示す限り、限定されない。たとえば、削減または減少は、元の量または程度に対して100%であってもよく、または50%または1%以下であってもよい。

10

## 【0031】

本発明は、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質、TTC7タンパク質、またはPI4KIII タンパク質の発現をダウンレギュレートすること、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質、TTC7タンパク質、およびPI4KIII タンパク質間の相互作用を弱めること、およびPI4KIII の酵素活性を阻害することなどの多様な作用が、シナプス欠損およびA<sub>42</sub>を発現する神経細胞の喪失などの加齢関連機能障害を改善することができることを明らかにし、これらの効果が、細胞のA<sub>42</sub>（特にA<sub>42</sub>）分泌を促進し、細胞膜または細胞におけるA<sub>42</sub>（特にA<sub>42</sub>）蓄積を減少させることによって達成されることを開示する。

20

## 【0032】

本発明では、たとえば、本発明者は、Efr3a遺伝子ノックダウンが、APP/PS1トランスジェニックマウスにおける海馬ニューロンの樹状突起および棘の萎縮を減少させることができる一方で、PI4KIII タンパク質の一般的な阻害剤であるフェニルアルシンオキシド(PAO)による胃管栄養は、脳脊髄液中のA<sub>42</sub>含量の増加を伴い得るが、APP/PS1マウスの学習および記憶を有意に改善することができ、脳組織中の細胞膜A<sub>42</sub>（特にA<sub>42</sub>凝集体/オリゴマー中のA<sub>42</sub>）の含量を減少させることができることを発見した。これらの結果は、APP/PS1マウスの認知症症状が、A<sub>42</sub>のニューロン分泌を促進し、ニューロンまたはニューロン膜におけるA<sub>42</sub>（特に、凝集したA<sub>42</sub>）の蓄積を低減することによって改善され得ることを実証した。

30

## 【0033】

本発明者らは、細胞またはニューロンにおけるRBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質、TTC7タンパク質、またはPI4KIII タンパク質の発現をダウンレギュレートすること、または膜上のPI4KIII タンパク質の局在を減少させるタンパク質複合体の形成を防止すること、またはPI4KIII タンパク質のホスホキナーゼ活性を阻害することが、細胞およびニューロンのA<sub>42</sub>分泌を促進し、ニューロンにおけるA<sub>42</sub>の蓄積を減少させ、AD関連の神経変性および機能障害を改善することができることを発見した；同時に、APPを切断するA<sub>42</sub>またはAPPの発現レベル、または、および-セクレターゼの活性はいずれも有意に影響されなかった。さらに、本発明者らは、PI4KIIIタンパク質の産物であるPI<sub>4</sub>Pが、A<sub>42</sub>モノマーのリポソーム内での凝集を促進するが、そのような促進はPI<sub>4</sub>Pの前駆体(PI)およびその誘導体であるPI<sub>4,5</sub>Pよりもずっと強力であることも発見した。

40

## 【0034】

本発明者らは、A<sub>42</sub>（A<sub>42</sub>を含む）が、血漿または細胞内器官から生成されると考えている；したがって、生成されたA<sub>42</sub>は、受動的放出、エキソサイトーシス、リソソーム媒介性放出、または他の未発見の経路によって細胞から分泌され得る。A<sub>42</sub>の起源またはそれがどのように分泌されるにもかかわらず、細胞膜はA<sub>42</sub>がそれを通して細胞を離れる最後の経路である。A<sub>42</sub>の疎水性のために、細胞膜上では、A<sub>42</sub>は、一方では疎水性脂肪酸鎖領域に挿入され、他方では、ホスファチジルイノシトール（特にリン酸化ホスファチジルイノシトールPI<sub>4</sub>P）および他の酸性リン脂質と相互作用し、このような相互作用は、A<sub>42</sub>のランダムコイルからβ-構造への立体配座変化を促進し、さらにA<sub>42</sub>凝集物として凝集して膜上に沈着するか、またはエンドサイトーシスによって細胞内に蓄積される。さらに、

50

可溶性A<sub>42</sub>（A<sub>42</sub>を含む）凝集体/オリゴマーの細胞またはリボソーム膜に対する親和性は、A<sub>42</sub>単量体の親和性よりもはるかに高いことが研究によって実証されている。したがって、凝集/オリゴマーA<sub>42</sub>は細胞膜上に蓄積するのがはるかに容易である。

【0035】

PI<sub>4</sub>Pは、PIおよびPIP<sub>2</sub>よりもA<sub>42</sub>凝集体/オリゴマーの形成に対してより強力な促進を示す、細胞膜リン酸化ホスファチジルイノシトールの主要成分である。本発明では、本発明者らは、リボソーム中のA<sub>42</sub>の凝集体/オリゴマー形成に対するPI<sub>4</sub>Pの促進効果が明らかに用量依存性であることを発見した。RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質、TTC7タンパク質、またはPI4KIII<sub>1</sub>タンパク質の発現をダウンレギュレートするか、それらのタンパク質複合体の形成を防止するか、またはPI4KIII<sub>1</sub>タンパク質のキナーゼ活性を阻害することにより、細胞膜上のPI<sub>4</sub>P産生を減少させることができる。したがって、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質、TTC7タンパク質、またはPI4KIII<sub>1</sub>タンパク質の発現をダウンレギュレートするか、またはRBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質、TTC7タンパク質、およびPI4KIII<sub>1</sub>タンパク質の膜結合タンパク質複合体の形成を防止するか、またはPI4KIII<sub>1</sub>タンパク質の対応するホスホキナーゼ活性を阻害することにより、細胞膜A<sub>42</sub>（A<sub>42</sub>を含む）とリン酸化ホスファチジルイノシトールとの間の相互作用を弱め、A<sub>42</sub>単量体のランダム形態に存在するより多くの細胞膜A<sub>42</sub>をもたらすために、細胞膜リン酸化ホスファチジルイノシトール（特にPI<sub>4</sub>P）の量を実質的に減少させることができる。上記のように、そのようなランダム形態のA<sub>42</sub>単量体は膜に対する親和性が低く、したがって膜から比較的容易に遊離され、細胞外に分泌される。したがって、上記の調節挙動は、APPの発現レベルまたは、およびセクレターゼの活性に影響を及ぼすことなく、細胞外A<sub>42</sub>レベルの明らかな増加をもたらすために、A<sub>42</sub>の細胞内蓄積を効果的に減少させることができる。

10

20

【0036】

以前の研究では、ショウジョウバエにおけるA<sub>42</sub>の蓄積がPI3Kおよび関連するPI3K/Aktのシナリング経路を活性化し、AD関連のシナプス欠損および長期記憶の喪失を誘導することが報告されている；対応して、関連研究では、PI3K活性を阻害することがADを治療する方法であり得ると考えられた。しかしながら、本発明において、本発明者らは、細胞内A<sub>42</sub>の蓄積が、ホスファチジルイノシトールキナーゼ（PI3Kを含む）のPI3K/Aktシナリング経路活性化によって引き起こされるのではなく、細胞膜ホスファチジルイノシトールキナーゼが活性化された後、膜上でリン酸化されたホスファチジルイノシトールにより直接的に引き起こされること；さらに、本発明に關与するホスファチジルイノシトールキナーゼが、PI3K/Aktのシグナル伝達経路においてPI3Kよりもむしろ主にPI4KIII<sub>1</sub>であることを発見した。たとえば、本発明者らは、PI4KIII<sub>1</sub>に高度に特異的であるがPA3などのPI3Kには感受性でないホスファチジルイノシトールキナーゼ阻害剤を用いることにより、細胞からのA<sub>42</sub>分泌を効果的に低濃度で促進することができることを発見した。

30

【0037】

このように、本発明者らによって、AD治療を達成するために、神経細胞または細胞膜におけるA<sub>42</sub>（A<sub>42</sub>を含む）蓄積を減少させるように、A<sub>42</sub>分泌、特にA<sub>42</sub>分泌を促進する方法を採用することが可能であることが明らかにされる。しかしながら、A<sub>42</sub>の増加した分泌は、APPのアップレギュレーションまたは、および分泌の活性の変化によって引き起こされるA<sub>42</sub>産生の増加に起因するものではない。

40

【0038】

A<sub>42</sub>と細胞膜中の糖類、脂質およびタンパク質との結合または相互作用を弱めることを含む、神経細胞のA<sub>42</sub>分泌を促進するための様々な経路が存在することが、当業者には理解可能である。本発明では、上記のように、細胞膜上のA<sub>42</sub>（特にA<sub>42</sub>）凝集を減少させることによって細胞のA<sub>42</sub>分泌を促進することが好ましい。

【0039】

さらに、本発明は、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質、TTC7タンパク質、およびPI4KIII<sub>1</sub>タンパク質の量および複合体を形成するそれらの能力を調節すること、ならびにPI4KIII<sub>1</sub>タンパク質のホスホキナーゼ活性を調節することによって、細胞のA<sub>42</sub>（特に、A<sub>42</sub>）

50

分泌を促進するために、細胞膜上に形成されたA凝集体/オリゴマーを減少させることができ、したがって、これらのタンパク質およびそれらの関係が、ADを治療するための潜在的な治療標的を構成し得ることを明らかにする。

【0040】

したがって、rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b遺伝子の発現、転写、または翻訳を阻害、低下、低減または排除することができ、それからコードされるRBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質の安定性を低下させることができる阻害剤または方法、ならびにホスファチジルイノシトールキナーゼPI4KIIIタンパク質およびTTC7タンパク質とのタンパク質複合体の形成を阻害することができる阻害剤または方法は、ADの治療に用いられる得ることを当業者には理解しうる。前記RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B阻害剤として、rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b遺伝子(アンチセンスRNA、siRNA、miRNAなどを含む)の阻害ヌクレオチド、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質に対する抗体などが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0041】

rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b遺伝子の阻害性ヌクレオチドは当該技術分野において周知であることが当業者には理解される(たとえば、www.genecards.orgを参照、および入手可能な製品: ORIGENE、カタログ番号SR308056およびカタログ番号TR303768)。同様に、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質に対する抗体は、当該分野において周知である(たとえば、www.genecards.orgを参照、および入手可能な製品: Novus、カタログ番号NBP1-81539; Thermo Fisher Scientific、カタログ番号PA5-24904)。

20

【0042】

また、上述したように、PI4KIII/PI4KA遺伝子の細胞発現、転写、または翻訳を調節すること、PI4KIII/PI4KA遺伝子からコードされるPI4KIIIタンパク質の安定性を調節すること、膜タンパク質RBO/EFR3/EFR3A/EFR3BおよびTTC7タンパク質との、PI4KIIIタンパク質の複合体形成能力を調節すること、およびPI4KIIIタンパク質のホスホキナーゼ活性を調節することは、ADを治療する方法であるとみなすことができる。したがって、PI4KIII/PI4KA遺伝子の発現、転写、または翻訳を阻害、低下、減少または排除することができるか、またはそこからコードされるPI4KIIIタンパク質の安定性を低下させることができる阻害剤または方法、限定的ではないが、PI4KIII/PI4KA遺伝子に特異的であるヌクレオチドなどの阻害ヌクレオチド、PI4KIIIタンパク質に対する抗体、PI4KIII

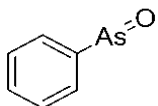
30

タンパク質と膜タンパク質とのタンパク質複合体形成を阻害し、キナーゼ活性を阻害し得る低分子化合物阻害剤が、ADを治療するために使用することができることが当業者には理解される。好ましくは、阻害剤は、低分子化合物、たとえばPAO(フェニルアルシンオキシド)、PAO誘導體、A1、G1、またはA1およびG1の類縁体である。より好ましくは、阻害剤は、PAOまたはPAO誘導體である。

【0043】

PAOは、オキソアルシン基とフェニル基とを含む塩基性構造を有する低分子化合物であり、PI4KIIIタンパク質のホスホキナーゼ活性に強い阻害作用を示すことが当業者には理解される。PAOの化学構造は:

【化1】



40

フェニルアルシンオキシド(オキソ(フェニル)アルサン)である。

【0044】

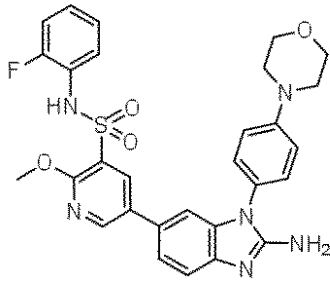
PAOの合成方法は、当業者に周知である。本発明によれば、ADの治療に用いることができる化合物は、化合物がPI4KIIIタンパク質のホスホキナーゼ活性における阻害効果を示す限り、PAOの誘導體をさらに含む。そのような誘導體の合成方法は当該技術分野において周知であることが当業者には理解される。

【0045】

50

同様に、A1およびG1の両方が、PI4KIII タンパク質の低分子化合物阻害剤であり、類似の構造を有することは、当業者には理解される。ここで、A1の化学構造は：

【化2】



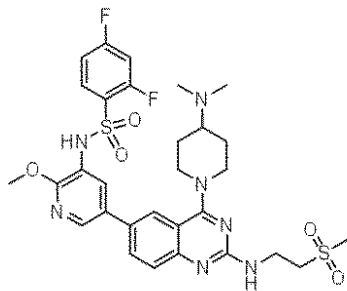
A1

5-(2-アミノ-1-(4-(4-モルホリニル)フェニル)-1H-ベンゾイミダゾール-6-イル)-N-(2-フルオロフェニル)-2-メトキシ-3-ピリジンスルホンアミド  
である。

【0046】

G1の化学構造は：

【化3】



G1

(aS)-5-(2-アミノ-4-オキソ-3-(2-(トリフルオロメチル)フェニル)-3,4-ジヒドロキナゾリン-6-イル)-N-(2,4-ジフルオロフェニル)-2-メトキシピリジン-3-スルホンアミド  
である。

【0047】

A1およびG1の合成方法は当該技術分野において周知である(たとえば、Bojjireddy, N., et al.(2014)、JBC 289:6120-6132; Leivers, A.L., et al.(2014)、JMC 57:2091-2106を参照)。本発明によれば、A1およびG1の構造類縁体は、それらがPI4KIII タンパク質のホスホキナーゼ活性に対して阻害効果を示す限り、ADを処置するために使用することができる。このような構造的類縁体の合成方法は当該技術分野において周知であることが当業者には理解される。

【0048】

さらに、PI4KIII タンパク質およびRBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質の膜複合体の形成は、足場タンパク質TTC7の補助を必要とする。したがって、本発明によれば、ttc7遺伝子の発現、転写、または翻訳を阻害、低下、低減、または排除することができ、およびそこからコードされるTTC7タンパク質の安定性を低下させることができる阻害剤または方法、ならびにRBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質およびPI4KIII タンパク質とのタンパク質複合体の形成を阻害することができる阻害剤または方法が、ADを治療するために使用することができることが当業者には理解される。前記TTC7阻害剤として、ttc7遺伝子の阻害性ヌクレオチド(アンチセンスRNA、siRNA、miRNAなどを含む)、TTC7タンパク質に対する抗体などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

10

20

30

40

50

さらに、本発明によれば、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質およびPI4KIII タンパク質の発現をダウンレギュレートするか、または膜上のPI4KIII タンパク質の分布を減少させるタンパク質複合体の形成を防止するか、またはPI4KIII タンパク質のホスホキナーゼ活性を阻害することが、本質的に、細胞膜PI<sub>4</sub>Pの減少をもたらし、細胞のA<sub>β</sub>分泌をさらに促進する。したがって、細胞膜PI<sub>4</sub>Pの量またはレベルを減少させ、および細胞膜上のA<sub>β</sub>凝集物/オリゴマーの形成をさらに減少させることができる任意の阻害剤または方法は、上記のようにADを治療する効果を達成することができることが当業者には理解される。

#### 【0050】

前述のPI<sub>4</sub>P阻害剤が、PI<sub>4</sub>Pに特異的に結合する抗体または他の分子であり得ることが当業者には理解される。現在、PI<sub>4</sub>Pに対する抗体の合成方法は、当該技術分野において周知である(Brown BK and Karasavass N, et al., 2007, J virol; Wassef NM and Roerdink F, et al. 1984, Mol Immunolを参照)。たとえば、それはヒト由来の広範な中和抗体4E10およびPI<sub>4</sub>Pに対する他の抗体であり得る。現在、PI<sub>4</sub>Pに特異的に結合する分子の合成方法は、当該分野で周知である(Balla A and Kim YJ, et al., 2008, Mol Biol Cell; Zubenko GS and Stiffler et al., 1999, Biol Psychiatryを参照)。たとえば、それは、OSH2-PH2X融合タンパク質またはOSH2-2x-PH融合タンパク質であり得る。

#### 【0051】

限定的ではないが、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bに対する抗体、PI4KIII に対する抗体、TTC7に対する抗体、PI<sub>4</sub>Pに対する抗体、rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b遺伝子に特異的な阻害ポリペプチド、PI4KIII /PI4KA遺伝子に特異的な阻害ポリペプチド、PI4KIII タンパク質のホスホキナーゼ活性を阻害する低分子化合物などの、ADを治療するために用いることができるか、またはADに対する治療可能性を有する本発明により提供される前述の物質(以下、総称して「本発明の物質」という。)を単離、精製、合成および/または組換えすることができる。

#### 【0052】

さらに、本発明の物質は、医薬組成物などの組成物に製剤化することもできる。これに関して、本発明は、上記抗体、阻害ポリペプチド、および/または低分子化合物のいずれか、ならびに薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

#### 【0053】

本発明の物質のいずれかを含有する本発明の医薬組成物は、抗体および低分子化合物、阻害ポリペプチドおよび抗体、または2種以上の抗体もしくは低分子化合物などの1種以上の本発明の物質を含むことができる。あるいは、医薬組成物は、本発明の物質を別の薬学的に活性な薬剤または薬物と組み合わせて含むこともできる。あるいは、医薬組成物は、本発明の物質を別の薬学的に活性な薬剤または薬物と組み合わせて含むこともできる。たとえば、それは、BapineuzumabなどのA<sub>β</sub> に対する抗体薬、または海洋由来硫酸化オリゴ糖HSH971およびその類縁体、アカンプロセート(トラミプロセート)およびその類縁体、エダラボンおよびその類縁体などのA<sub>β</sub> 凝集をブロックするために脳の神経細胞外A<sub>β</sub> または アミロイド斑に結合する化合物、またはA<sub>β</sub> 凝集物の脱凝集を促進する化合物を含むことができる。このようにして、医薬組成物は、一方ではニューロンからのA<sub>β</sub> 分泌を促進し、他方ではニューロン外のA<sub>β</sub> の除去を促進し、それによりADの治療に対してより良好な治療効果を達成する。

#### 【0054】

別の態様では、本発明は、ADの治療のための新規医薬品または治療標的をスクリーニングするための方法を提供する。この方法は、本発明の前述の発見に基づいて設計されており、すなわち、AD関連神経変性および機能障害を改善および予防するために、A<sub>β</sub> 分泌を促進することによって、細胞内A<sub>β</sub> 蓄積を減少させることができる。したがって、医薬品または治療標的をスクリーニングするための基準は、医薬投与または治療標的の調節後のA<sub>β</sub> 分泌、特にA<sub>β</sub> 分泌における促進効果であり、A<sub>β</sub> 分泌の増加が、 、 、および -セクレターゼの活性の変化によって引き起こされるAPPのアップレギュレーションま

10

20

30

40

50

たはA 産生の増加に起因することはない。

【0055】

本発明によれば、治療標的の調節は、治療標的の周辺環境との機能、特性、または関係を変化させるように、関連する物質を治療標的に直接的または間接的に作用させるために用いて、細胞のA 分泌(特に、A<sub>42</sub>分泌)の促進を誘導することを意味する。

【0056】

アルツハイマー病を治療するのに有効な薬物を選択するために、スクリーニング試験のための細胞株は、哺乳動物、昆虫由来の核細胞株、たとえば、HEK293、COS7、N2a、SH-SY5Y、S2、sf9等であり得ることが当業者には理解される。方法は、アルツハイマー病を治療するのに有効な薬物を選択するために候補薬物がA 蓄積、特にA<sub>42</sub>の蓄積を細胞膜上または細胞内で減少させるかどうかを試験することを含む。好ましくは、A 分泌が増加しているかどうかの試験は、APPを過剰発現する細胞株(たとえば、ヒト由来APPで安定にトランスフェクトされたHEK293、COS7、N2a、SH-SY5Y細胞株)またはショウジョウバエのモデル、好ましくは第3齢ショウジョウバエの幼虫の組織で行われうる。A 分泌が増加するかどうかは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)または電気化学発光アッセイ(ECLIA)などのイムノアッセイの方法で検出されうる。

10

【0057】

好ましくは、ADの治療のための医薬または治療標的をスクリーニングする方法は、PI4K III の酵素活性における候補薬剤または標的調節の発明の効果を観察し、候補薬剤または標的調節の発明が、検出系におけるPI4K III キナーゼの機能に否定的に影響を及ぼす場合、すなわち、PI4K III キナーゼ活性または細胞膜PI<sub>4</sub>Pレベルの低下を特徴とする場合、候補薬医薬、薬剤または標的がADを治療するための可能性のある薬剤または治療標的であることを示す；ことを含む。このようなスクリーニング後、細胞内A (特にA<sub>42</sub>) 蓄積が減少するかどうか、および細胞外A 分泌が促進されるかどうかをさらに検出される。これらの方法では、候補のスクリーニング効率を大幅に改善することができる。

20

【0058】

本発明の1つの特定の実施態様によれば、ADの治療のための医薬または治療標的をスクリーニングする方法は、候補薬または治療標的の調節の発明が、膜上のPI4K III タンパク質の量を減少させるように、細胞膜PI4K III タンパク質を細胞質に再分布させるかどうか、および細胞膜A 単量体の凝集/オリゴマー化の減少ならびに細胞外分泌の増加を誘導するかどうか、を直接分析することに基づいて決定することを含む。好ましくは、蛍光標識PI4K III が、蛍光タンパク質(GFP-PI4K III )で標識したPI4K III などの観察のために選択され、蛍光標識PI4K III が細胞膜から細胞質に移動するかどうかを観察することができる。

30

【0059】

本発明の1つの特定の実施態様によれば、AD治療のための医薬または治療標的をスクリーニングする方法は、タンパク質間の相互作用を分析する同時免疫沈降アッセイなどの方法で行うこともできる。候補薬剤または治療標的の調節の発明が、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3Bタンパク質、TTC7タンパク質およびPI4K III タンパク質間の相互作用を減少させる場合、薬剤または治療標的が、細胞膜A 単量体の凝集を減少させるように膜タンパク質複合体を形成する際のPI4K III タンパク質の能力を弱め、ならびに、細胞外分泌を増加させることができることを示す

40

【0060】

本発明の1つの特定の実施態様によれば、候補薬剤または治療標的の調節の発明が、細胞膜PI<sub>4</sub>Pレベルを低下させるかどうかを直接分析することによって、ADの治療のための医薬または治療標的をスクリーニングする方法を実施することもできる。好ましくは、蛍光タンパク質で標識されたOSH2-PH2XまたはOSH2-2x-PH融合タンパク質などのPI<sub>4</sub>Pに特異的に結合する蛍光標識分子が、細胞膜量において減少するかどうか、または細胞膜から細胞質に転移するかどうかを観察するために、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、または2光子顕微鏡を利用することができる。

50

## 【0061】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。しかしながら、本発明を実施する方法は、以下の実施例に限定されない。

## 【0062】

以降、主に動物および細胞培養実験によりデータを取得し、SPSSソフトウェアで分析する。特に明記しない限り、データは平均±SEMで表される。P<0.05は、その差が統計的に有意であることを示す。これ以降に示されるすべてのデータは、平均±SEMで表される。「\*」、「\*\*」、および「\*\*\*」はそれぞれ、それぞれp<0.05、0.01および0.001を表す。

## 【実施例1】

## 【0063】

ショウジョウバエ系統および遺伝学的方法

25 の一定温度下で培養する標準培地、12時間明期および12時間暗期の交互サイクル。

## 【0064】

以下のトランスジェニックショウジョウバエ系統を本発明において利用した： $rbo^{S358A}$ 、[UAS] $A_{arc}$ 、[UAS] $A_{42}$ 、[UAS]dtau、[UAS]mCD8-gfp(Dr. Z. Wangによって提供された)、[UAS]shibire<sup>ts1</sup>(Dr. A Guoによって提供された)、[Gal4]A307(Dr. O'Kaneによって提供された)。ここで、 $rbo^{S358A}$ 遺伝子は、部位特異的突然変異によるrbo遺伝子を含む野生型ゲノムDNAから構築された導入遺伝子であり、その発現はrbo遺伝子自体のプレドライバによって駆動される。[Gal4]A307は、転写因子であるGal4を発現し、[UAS] $A_{arc}$ 、[UAS] $A_{42}$ 、[UAS]dtau、[UAS]mCD8-gfp、[UAS]shibire<sup>ts1</sup>導入遺伝子を駆動させて、 $A_{arc}$ 、 $A_{42}$ 、dTau、mCD8-GFPまたは温度感受性突然変異Dynaminを、巨大繊維経路のニューロンおよび少量の他のニューロンにおいて発現させる。本発明で利用されるショウジョウバエ突然変異体として、以下のものが挙げられる： $rbo^{ts1}$ (温度感受性ミスセンス突然変異)、 $rbo^2$ (ノックダウン突然変異)、itpr<sup>sv35</sup>(ナンセンス突然変異、ブルーミントNSTック#30740)、PI4KIII<sup>def</sup>(PI4KIII 遺伝子および末梢DNAの欠失を有する突然変異、ブルーミントNSTック#9518)、PI4KIII<sup>GS27</sup>およびPI4KIII<sup>GJ86</sup>(両方ともナンセンス突然変異)。P{lacW}I(2)k14710k<sup>15603</sup>トランスポソンは、I(2)k14710(ブルーミントNSTック#11134)；P{EPgy2}bin3<sup>EY09582</sup>(ブルーミントNSTック#20043)の転写を防止するために、I(2)k14710遺伝子の第一エクソンに挿入される。遺伝的バックグラウンドを精製するために、使用前に5世代以上にわたり、全ての導入遺伝子および突然変異体ハエを野生型の同質遺伝子型系統(同質遺伝子w<sup>1118</sup>、ブルーミントNSTック#5905)と戻し交配した。

## 【0065】

本発明者らの先行研究は、GF経路のニューロンにおける野生型または北極変異体 $A_{42}$ を発現するハエ(ショウジョウバエ)( $A_{42}$ または $A_{arc}$ ハエもしくはショウジョウバエ)が、ニューロン内 $A_{42}$ 蓄積、日齢依存性シナプス伝達不全および早期死を示すことを発見した。このようなハエはまた、日齢に依存したクライミング能力の低下を示す。神経細胞内 $A_{42}$ 蓄積によって引き起こされる神経欠損におけるrbo遺伝子の役割を研究するために、rbo遺伝子の2つの突然変異、ミスセンス突然変異( $rbo^{ts1}$ )およびノックダウン突然変異( $rbo^2$ )を $A_{arc}$ ハエに導入し、シナプス伝達、クライミング能力および日齢における効果をそれぞれ試験した。4群のハエを構築した：対照ハエ(コントロール、ctrl)、 $rbo^{ts1/+}$ または $rbo^{2/+}$ ヘテロ接合体( $rbo$ )、 $A_{arc}$ ハエ( $A_{arc}$ )、および $rbo^{ts1/+}$ または $rbo^{2/+}$ ヘテロ接合突然変異を有する $A_{arc}$ ハエ( $A_{arc}-rbo$ )。各群は1~2系統を含み、ここで、「ctrl」は、[Gal4]A307導入遺伝子を有する野生型対照ハエを示す；「 $rbo^{ts1/+}$ 」および「 $rbo^{2/+}$ 」は、[Gal4]A307導入遺伝子の1コピーを有する $rbo^{ts1/+}$ および $rbo^{2/+}$ ヘテロ接合性ハエを示し；「 $A_{arc}$ 」は、[Gal4]A307/[UAS] $A_{arc}$ 二重トランスジェニックハエを示し；「 $A_{arc}-rbo^{ts1/+}$ 」および「 $A_{arc}-rbo^{2/+}$ 」は、それぞれ、[Gal4]A307- $rbo^{ts1}/[UAS]A_{arc}$ および[Gal4]A307- $rbo^2/[UAS]A_{arc}$ を示す。最初の2群のハエは $A_{arc}$ を発現せず、「ノン $A_{arc}$ ハエ」と分類され、後者の2群のハエは $A_{arc}$ を発現し、「 $A_{arc}$ ハエ」と分類された。

10

20

30

40

50

## 【実施例 2】

## 【0066】

rbo遺伝子突然変異は、シナプス伝達検査によって試験されるように、A<sub>42</sub>発現ショウジョウバエの神経欠損を特異的に抑制する。

## 【0067】

シナプス伝達の検査方法：

細胞内での巨大繊維(GF)系における興奮性接合電位(EJP)の記録。特定の日齢の成体雌ハエを、解剖顕微鏡下で低融点ワックスであるタッキーワックス(Boeckel Scientific)でガラススライド上に腹側を下にして載せた。記録システムは、腹部内に1つの参照電極、2つの目に挿入された2つの刺激電極、および背側縦筋細胞に挿入された1つの記録電極を包含する。両眼を電気刺激(100Hz、50パルス)に付した。刺激強度は5~20ボルトであり、持続時間は0.2msであり、閾値刺激強度の約150%である。電気信号をAxonalクランプ900A(Molecular Devices)で記録および増幅し、Digidata 1440A(Molecular Devices)によって周波数10kHzでデジタル化した。データを、pClampソフトウェア(バージョン10.0; Molecular Devices)によって記録および分析した。すべての電極は、3M KCl溶液で満たされたガラス電極である。記録中の環境温度は25℃であった。

10

## 【0068】

図1は、4群のハエにおける異なる日齢における脳刺激されたEJPの代表的記録(図1a)を示し、誘発されたEJPの成功率の定量分析(図1b)を示す。特に、rbo突然変異は、A<sub>arc</sub>によって引き起こされる日齢依存性ニューロンシナプス伝達障害を有意に阻害することに留意されたい。統計解析は、第3-7日、第15-17日、および第25-27日(n=6-12)、第31-35日(n=10-23)のデータに対して一元配置ANOVAを用いて行った。

20

## 【0069】

上記のシナプス伝達検査方法によれば、羽化後、第3-7、第15-17、第25-27および第31-35日に、高周波電気刺激下(100Hz、50パルス)の背側縦筋線維におけるEJPの細胞内記録を行った。第1群における高周波電気刺激によって誘発されたEJPの成功率は、第3-7日および第15-17日における他の3群と有意に異ならなかった(図1a-1b)。第25-27日および第31-35日において、A<sub>arc</sub>-rboハエにおけるEJPの成功率は、対照ハエおよびrboハエのそれよりも低くなったが、A<sub>arc</sub>ハエのそれより有意に高かった(図1aおよび1b)。

## 【0070】

これらの結果は、rbo遺伝子突然変異が、ニューロン内A<sub>arc</sub>蓄積によって引き起こされる日齢依存的なシナプス伝達障害を改善することを示している。4つの群のハエを作製するために使用されるトランスジェニックハエおよびrbo突然変異体の遺伝的バックグラウンドは、使用前に5世代以上にわたり野生型同遺伝子型系統(同遺伝子型w<sup>1118</sup>)と戻し交配され、遺伝的バックグラウンドは本質的に精製されるので、遺伝的背景の違いが寛解に寄与したとは考えにくい。rbo遺伝子の完全ノックダウンは胚の致死性を引き起こすので、A<sub>arc</sub>誘導性シナプス伝達障害におけるその効果を調べることはできなかった。

30

## 【実施例 3】

## 【0071】

rbo遺伝子突然変異は、チューブクライミング能力アッセイによって試験されるように、A<sub>42</sub>発現ハエの神経欠損を特異的に抑制する。

40

チューブクライミング試験：

クライミング能力を、垂直に配置された試験管の底部からの7秒目における10匹のハエの平均クライミング高さを測定することによって調べた。高い再現性を有するミバエのクライミング能力試験装置を開発した。装置は、以下を包含する：1) その中に透明プラスチックチューブ10本が垂直に取り付けられる矩形の金属フレーム(幅32cm、高さ21cm)；2) 金属フレームの上下動を駆動するための電動モータ；3) 金属フレームを所定の高さで1分間隔で4回上下に迅速に移動させる作業サイクルで電動モータを制御するためのステッピングアクチュエータ；4) クライミングプロセスをビデオ撮影するビデオカメラ；5) ビデオの特定の時間におけるハエのクライミング位置を分析する分析ソフトウェア。実験

50

では、特定の遺伝子型の10匹のハエが各透明プラスチック管に移された。チューブは均一に分配され、金属箱に取り付けられた。金属箱は、基盤上に垂直に取り付けられた2本の金属棒に沿って垂直に摺動することができる。クライミングテストでは、ステッピングアクチュエータが電動機を制御して金属箱を5.8cm持ち上げ、次いで、解放し、金属箱が重力によって元の位置に落ちるようにする。金属箱の動きが止まると、ファイルはチューブの底に落ちる。金属箱の動きが止まると、ハエは、チューブの底に落ちた。金属箱を3秒間で4回上下に動かした後、すべてのハエは、チューブの底にいた。その後、ハエは、チューブの壁に沿って登ることが許された。その後の分析のために全工程を録画した。本発明者らは、チューブクライミングが開始された後の任意の時点におけるハエの高さを測定するためのコンピュータプログラムを開発した。

10

## 【0072】

図1cにおいて、*rbo*遺伝子突然変異は、 $A_{arc}$ 発現ハエの日齢依存性クライミング能力を改善し、一元配置ANOVA分析を実施した、 $n=3$ (3群のハエ、各群10匹のハエ)。

## 【0073】

羽化後、3日目、16日目、26日目、31日目にクライミング能力を調べた。3日目および16日目には、4つの群のハエのクライミング能力は類似していた(図1c)。26日目と31日目では、 $A_{arc-rbo}$ のハエは、 $A_{arc}$ のハエよりも有意に高く登ったが、対照および*rbo*のハエほど高くはなかった(図1c)。

## 【実施例4】

## 【0074】

*rbo*遺伝子突然変異は、長寿検定により試験されるように、 $A_{42}$ 発現ハエの神経欠損を特異的に抑制する。

20

長寿(寿命)アッセイ：

標準ハエ用食物と乾燥酵母を入れた5本または10本のチューブに、各遺伝子型の100または200匹のハエを均等に分け、25℃で培養した。ハエを3日毎に新鮮な食物と乾燥酵母を入れた試験管に移し、各移送時に死んだハエを数えた。生存率をSPSS 11 Kaplan-Meierソフトウェアで分析した。

## 【0075】

図1dにおいて、*rbo*遺伝子突然変異は、 $A_{arc}$ を発現するハエの寿命を延長した。各群につき $n=200$ のハエ、 $p < 0.001$ 、ログランク検定。

30

## 【0076】

図7は、3つの群のハエの異なる日齢における脳刺激されたEJP(図7a)および誘発されたEJPの成功率(図7b)の代表的記録を示す。「ctrl」は、[Gal4]A307導入遺伝子を有する野生型対照ハエを示し；「 $A_{42}$ 」は、[Gal4]A307/[UAS] $A_{42}$ 二重トランスジェニックハエを示し；「 $A_{42-rbo}^{ts1/+}$ 」および「 $A_{42-rbo}^{2/+}$ 」は、それぞれ、[Gal4]A307-*rbots1*/[UAS] $A_{42}$ および[Gal4]A307-*rbo2*/[UAS] $A_{42}$ を示す。*rbo*突然変異は、 $A_{42}$ によって引き起こされる日齢依存性の神経細胞シナプス伝達障害を有意に阻害することが注目される。3-5日目のデータについては、 $n=6 \sim 12$ 、37~39日目のデータについては、 $n=10 \sim 12$ である、一元配置ANOVA分析。

40

## 【0077】

図7cにおいて、*rbo*遺伝子突然変異は、 $A_{42}$ 発現ハエの日齢依存性クライミング能力を改善し、一元配置ANOVA分析を実施した( $n=3$ )。

## 【0078】

図7dにおいて、*rbo*遺伝子突然変異は、 $A_{42}$ を発現するハエの寿命を延ばした。各群について $n=200$ 匹のハエ、 $p < 0.001$ 、ログランク検定。

## 【0079】

長寿アッセイは、 $A_{arc-rbo}$ ハエの寿命は、 $A_{arc}$ ハエの寿命よりも長い、対照および*rbo*ハエの寿命よりも短いことを示した(図1d)；4つの群のハエの平均寿命を比較することによって同じ結論が得られる(第1表)。これらの結果は、シナプス伝達検査の結果と一致する。

50

野生型  $A_{42}$  を発現するハエのシナプス伝達、クライミング能力および寿命における *rbo* 遺伝子突然変異の影響に関するさらなる研究が行われ、それは、より良好な改善を示した(図7a-d)。

【0080】

第1表：ハエの平均寿命とその比較

【表1】

ハエ	平均寿命(日)	p値(対照群と比較)	p値( $A\beta_{arc}$ 群と比較)
ctrl	47.5	n. a.	<0.001
<i>rbo</i> <sup>ts1/+</sup>	46.2	0.201	<0.001
<i>rbo</i> <sup>2/+</sup>	54.3	<0.001	<0.001
$A\beta_{arc}$	27.0	<0.001	n. a.
$A\beta_{arc}$ - <i>rbo</i> <sup>ts1/+</sup>	39.9	<0.001	<0.001
$A\beta_{arc}$ - <i>rbo</i> <sup>2/+</sup>	36.8	<0.001	<0.001

10

20

【0081】

図8aは、ショウジョウバエの巨大繊維経路におけるショウジョウバエタウタンパク質過剰発現によって誘導された運動障害(左)および早期死における *rbo* 遺伝子突然変異の効果を示す。図8bは、ショウジョウバエ巨大線維経路における  $A_{arc}$  過剰発現によって誘導された運動障害(左)および早期死における *shibire* 遺伝子突然変異の効果を示す。長寿アッセイでは、各群について  $n=100$  匹のハエ、ログランク検定を行った。

【0082】

*rbo* 遺伝子突然変異が、タウタンパク質を過剰発現するハエの寿命短縮を改善できなかったため、 $A_{42}$  毒性に対する *rbo* 遺伝子突然変異の効果は、毒性タンパク質のニューロン内蓄積に対する一般的な効果に帰属することができなかった(図8a)。*Shibire* 遺伝子の突然変異(*shibire*<sup>ts1</sup>)を  $A_{arc}$  のハエに導入することは、 $A_{arc}$  のハエの早期死を弱めることができなかったため、 $A_{42}$  毒性に対する *rbo* 遺伝子突然変異の効果は、シナプスまたはエンドサイトーシス機能に潜在的に基づく一般的な効果に帰属することができなかった(図8b)。*rbo*<sup>ts1</sup> 遺伝子突然変異と同じく、*shibire*<sup>ts1</sup> 遺伝子突然変異は、温度依存性シナプス伝達、バルクエンドサイトーシスおよび運動能力にも影響を与えた。

30

【0083】

実施例1~4では、結果は、*rbo* 遺伝子突然変異または機能不全が、野生型および突然変異  $A_{42}$  発現ハエにおける神経欠損を特異的に抑制し得ることを示した。

【実施例5】

40

【0084】

RBOタンパク質と相互作用するPI4KIII 酵素の欠損または阻害は、免疫沈降アッセイによって試験されるように、 $A_{arc}$  のハエの神経欠損を改善する。

免疫沈降およびイムノプロット：

全部で300個のハエの頭を収集し、500  $\mu$ Lの予め冷却したTris緩衝液中で粉砕することによってホモジナイズした。トリス緩衝液の処方物は、50mM Tris、50mM KCl、1mM EDTA、1%カクテルプロテアーゼ阻害剤(Calbiochem)を含み、pHを7.4に調整したものである。組織ホモジネートを10000gで10分間遠心分離した。上清を回収し、約1  $\mu$ gのRBOに対するマウスモノクローナル抗体またはショウジョウバエPI4KIII に対するウサギポリクローナル抗体で免疫沈降またはイムノプロット試験を行った。Abmart(上海)またはAbgent(

50

中国)と共同で2つの抗体が生成された。ショウジョウバエ垂種C RBOタンパク質の251~500番目のアミノ酸を用いてRBO抗体を作成した;ペプチドNH<sub>2</sub>-KRSNRKRLQYQKDSYC-CONH<sub>2</sub>(配列番号:3)を用いてPI4KIII 抗体を作成した。イムノプロット試験では、ショウジョウバエRBOおよびPI4KIII に対する抗体を1:2000で希釈した。野生型および対応するホモ接合変異体の頭部組織ホモジネートを、それぞれショウジョウバエRBOおよびPI4KIII に対する抗体を検出するために用いた。

【0085】

図9aにおいて、*rbo*<sup>S358A</sup>遺伝子突然変異は、*A<sub>arc</sub>*を発現するハエの寿命を改善しなかった(P=0.07)。

【0086】

RBOは、推定ジアシルグリセロール(DAG)リパーゼであり、DAGリパーゼの活性はAD患者および動物モデルの海馬で増加すると報告されているが、RBOタンパク質は、*A<sub>arc</sub>*ハエへの導入遺伝子*rbo*<sup>S358A</sup>の導入が早期死を変化させることができなかったため、DAGリパーゼとして作用することによって*A<sub>arc</sub>*毒性を調節しなかった可能性がある(図9a)。*rbo*<sup>S358A</sup>遺伝子によってコードされるRBOタンパク質において、推定上の酵素活性中心が突然変異された。

【0087】

図1eは、RBOタンパク質およびPI4KIII タンパク質の共免疫沈降の代表的なイムノプロットを示す(n=3)。

【0088】

図1fは、野生型対照ハエおよび*rbo*ヘテロ接合体におけるRBOタンパク質およびPI4KIII タンパク質レベルの代表的なイムノプロット(左)および半定量的分析(右)を示す(n=7、一元配置ANOVA分析)。

【0089】

図1gは、野生型(wtRBO)および突然変異体(mRBO)RBOタンパク質、n=4、t検定分析で共免疫沈降したPI4KIII の代表的なイムノプロット(左)および半定量分析(右)を示す。

【0090】

図1hは、*A<sub>arc</sub>*、*A<sub>arc</sub>-rbo*<sup>ts1/+</sup>および*A<sub>arc</sub>-rbo*<sup>2/+</sup>ハエ、n=5-6、一元配置ANOVA分析におけるPI4KIII mRNA発現レベルのRT-PCR定量分析を示す。

【0091】

酵母およびマウスのRBO相同体は、PI4KIII を補充し、それと細胞膜上で複合体を形成する。これと一致して、RBOタンパク質は、ショウジョウバエPI4KIII と特異的に免疫共沈降した(図1e)。さらに、*A<sub>arc</sub>-rbo*ショウジョウバエにおいて*rbo*遺伝子(*rbo*<sup>2/+</sup>)の1コピーを除去することにより、RBOタンパク質およびPI4KIII タンパク質の発現レベルを有意に低下させることができ(図1f)、*rbo*<sup>ts1/+</sup>遺伝子突然変異は、RBOタンパク質およびPI4KIII タンパク質の発現レベルを有意に減少させなかったが、RBOタンパク質とPI4KIII タンパク質との間の相互作用を有意に弱めた(図1g)。特に、2つの*rbo*突然変異のいずれも、PI4KIII 遺伝子の転写を変化させなかった(図1h)。

【0092】

PI4KIII が、*A<sub>arc</sub>*ハエの神経欠損においてRBOタンパク質と同様の役割を果たすかどうかを試験するために、染色体欠損(染色体のPI4KIII 含有DNA断片の欠失、*pi4k*<sup>def/+</sup>)およびPI4KIII のナンセンス変異(*PI4KIII*<sup>GS27/+</sup>)を別々に*A<sub>arc</sub>*発現ハエに導入した。

【0093】

図2は、ヘテロ接合*PI4KIII* 遺伝子欠失(*PI4KIII*<sup>def/+</sup>)(図2a参照)またはナンセンス変異(*PI4KIII*<sup>GS27/+</sup>)(図2b参照)によってシナプス伝達、運動機能および早発死が抑制されたこと、ならびにPAOによって抑制されたこと(図2c-e)を示す。「ctrl」は、[Gal4]A307導入遺伝子を有する野生型対照ハエを示す;「*PI4KIII*<sup>def/+</sup>」および「*PI4KIII*<sup>GS27/+</sup>」は、[Gal4]A307導入遺伝子の1コピーを有する*PI4KIII*<sup>def/+</sup>および*PI4KIII*<sup>GS27/+</sup>ヘテロ接合性ハエを示す;「*A<sub>arc</sub>*」は[Gal4]A307/[UAS]*A<sub>arc</sub>*二重トランスジ

10

20

30

40

50

エニックハエを示す；「A<sub>arc</sub>-PI4KIII<sup>def/+</sup>」および「A<sub>arc</sub>-PI4KIII<sup>GS27/+</sup>」はそれぞれ、PI4KIII<sup>def/+</sup>；[Gal4]A307/[UAS]A<sub>arc</sub>およびPI4KIII<sup>GS27/+</sup>；[Gal4]A307/[UAS]A<sub>arc</sub>を示す。各群のEJPデータ記録については、n=6~10である。各クライミングアッセイについて、n=3~5である。各ハエ系統の寿命データについては、n=100~200、P値は0.001未満である。統計的分析方法は上記の通りである。

#### 【0094】

実際、実験結果は、そのようなPI4KIII 突然変異が、シナプス伝達、運動機能、および寿命におけるA<sub>arc</sub>誘導性欠損を抑制することを実証した(図2a-b)。一貫して、PI4KIII 阻害剤PAOをA<sub>arc</sub>ハエに給餌することもまた、用量依存的にこれらの欠陥を有意に改善した(図2c-e)。

10

#### 【0095】

図9bにおいて、itpr<sup>SV35</sup>遺伝子突然変異は、A<sub>arc</sub>発現ハエのシナプス伝達または寿命を改善しなかった(P=0.13)。長寿アッセイでは、各群についてn=100のハエで、ログランク検定を行った。誘発されたEJPの成功率分析では、n=5である。

#### 【0096】

しかしながら、IP3Rをコードする遺伝子のナンセンス突然変異をA<sub>arc</sub>発現ハエに導入することが、シナプス障害または早期死を減弱させることができなかつたため(図9b~c)、RBO/PI4KIII を下方制御することによる神経欠損の抑制は、ホスホリパーゼC、PI<sub>4,5</sub>Pおよびイノシトール三リン酸(IP3R)の受容体によって媒介されるカルシウム放出の減弱によって引き起こされる毒性効果には寄与できなかった。

20

#### 【実施例6】

#### 【0097】

RBO/PI4KIII のダウンレギュレーションは、染色およびイメージングによって検出されるように、細胞内A<sub>42</sub>蓄積を減少させる。

染色およびイメージング：

ショウジョウバエの中樞神経系は、以下のように染色された。脳および腹側神経節を含む、ハエの全中枢神経系(CNS)を冷PBS中で解剖し、PBS中の4%PFAで約45分間固定した。調製物をPBSで30分間洗浄し、ギ酸(水中、70%)で45分間処理して抗原決定基を再暴露し、0.25%トリトンを補充したPBS溶液中の5%BSAで繰り返し洗浄し、4で10-12時間、一次抗体(6E10、1:100希釈)とインキュベートし、再びPBSで洗浄し、最後に、cy3結合二次抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories、1:200希釈)と室温で2時間インキュベートした。ニコンA1R-A1共焦点顕微鏡下で画像を撮影した；ハエCNSの遺伝子型はイメージング要員にはブラインドであった。

30

#### 【0098】

図3aは、21~25日齢のmCD8-GFPを発現する対照ハエ(上段)およびA<sub>arc</sub>発現ハエ(中段)における腹側神経節の全マウントA 染色の共焦点画像を示す；mCD8-GFPおよびA<sub>arc</sub>の発現は、両方とも[Gal4]A307によって駆動された。各群の染色を2回繰り返した；下段の行は、中央の行の四角で囲まれた領域の拡大図である。図3bは、各群の染色が2回繰り返された、21~25日齢のA<sub>arc</sub>、A<sub>arc</sub>-rbo<sup>ts1/+</sup>、A<sub>arc</sub>-rbo<sup>2/+</sup>、A<sub>arc</sub>-PI4KIII<sup>def/+</sup>、およびA<sub>arc</sub>-PI4KIII<sup>GS27/+</sup>ハエの腹側神経節の全マウントA 染色の代表的な共焦点画像を示す；一方、図3c(上)は、ELISA法によって定量化された頭部A レベルを示す。図3c(下)は、ELISA法によって定量化された、異なる濃度でPAO処理したA<sub>arc</sub>発現ハエにおける頭部A レベルを示す。ELISA定量分析、一元配置ANOVA分析において各データ群についてn=3~5であった。図3a~3bにおいて、スケールバーは50μmを表す。

40

#### 【0099】

以前は、GF経路におけるA<sub>arc</sub>発現によって誘導されたニューロン損傷は、細胞内蓄積A タンパク質に起因していた。ここで、我々はさらに、A<sub>arc</sub>ショウジョウバエにuas-mCD8-gfp導入遺伝子を導入することによる、A の神経細胞内蓄積を確認した。uas-mCD8-GFPは、A<sub>arc</sub>を発現するニューロンをGFPで標識することができるように、細胞膜を標的とし、A<sub>arc</sub>のものと同一ドライバーによって駆動される、mCD8-GFP蛍光タンパク質を発

50

現する。共焦点イメージングは、A<sub>arc</sub>免疫染色シグナルがGFPシグナルと共局在することを明らかにし(図3a)、このハエモデルにおけるニューロン内A<sub>arc</sub>蓄積の現象を実証した。

【0100】

RBO/PI4KIII 不全が細胞内A<sub>arc</sub>蓄積に影響を及ぼすかどうかを分析するために、A<sub>arc</sub>免疫染色をA<sub>arc</sub>、A<sub>arc</sub>-rboおよびA<sub>arc</sub>-PI4KIII ハエで実施した。A<sub>arc</sub>-rboおよびA<sub>arc</sub>-PI4KIII ハエの免疫染色シグナルは、A<sub>arc</sub>ハエの免疫染色シグナルと比較して有意に減少したことが見出された(図3b)。

【実施例7】

【0101】

RBO/PI4KIII のダウンレギュレーションは、ELISA定量分析によって検出されるように、細胞内A<sub>42</sub>蓄積を減少させる。

10

ELISA法分析：

ELISAは、A<sub>42</sub>Human ELISA Kit(Invitrogen)を製造者の仕様書に従って用いて行った。CNSにおけるA<sub>42</sub>レベルを分析するために、1系統あたり25匹のハエの無傷の脳を冷PBS中で解剖し、直ちにカクテルプロテアーゼ阻害剤(Calbiochem)を補充した冷ELISA試料希釈緩衝液に入れた。脳を十分にホモジナイズし、室温で4時間インキュベートし、-20℃で保存した。

【0102】

実施例6と同様に、ELISA定量分析は、PAO処理後に、A<sub>arc</sub>-rboハエ、A<sub>arc</sub>-PI4KIIIハエ、およびA<sub>arc</sub>ハエにおいて、A<sub>42</sub>の量が有意に減少したことを示す(図3c~3d)

20

【0103】

図10aは、RT-PCR法によるN2細胞におけるEFR3a遺伝子のノックダウン効率(左)および正規化された定量(中)を示し、右の図は、EFR3a遺伝子ノックダウンがN2a細胞の細胞外A<sub>42</sub>のエンドサイトーシスに影響しないことを示す。EfraノックダウンRNAiを構築するために使用される配列は、5'-AGGTATCATTCAGGTTCTGTT-3'(配列番号：4)である。図10bは、RT-PCR法によって、rboおよびPI4KIIIa遺伝子突然変異が、A<sub>arc</sub>発現ハエのA<sub>arc</sub>転写レベルを低下させないことを示す。

【0104】

実施例6~7では、RBO/PI4KIII ダウンレギュレーションによって誘導されるニューロン内A<sub>arc</sub>蓄積の減少は、細胞外A<sub>42</sub>の取り込みの減少のためによるものである可能性が低いことが示される。その理由は、以下の通りである：1) rboホモログ遺伝子ノックダウンを有するN2a細胞における細胞外A<sub>42</sub>の取り込みが、有意に減少しないこと(図10a)；2) 異なる日齢のA<sub>arc</sub>-rboおよびA<sub>arc</sub>-PI4KIIIaハエにおけるA<sub>arc</sub>mRNA発現レベルが、実験群のA<sub>arc</sub>ハエと比較して減少しないこと(図10b)。

30

【実施例8】

【0105】

PI4KIII 阻害剤PAO、A1およびG1の溶液調製および毒性試験

HEK293細胞、ショウジョウバエの幼虫および成虫を、PAOまたはA1で処理し、PAO粉末(Sigma-Aldrich、CAS NO.637-03-6)およびA1粉末をDMSOに溶解することによって、10mMおよび0.9mMのA1のストック溶液を別々に作製した。次いで、蒸留水で勾配希釈して所望の濃度にした；実験結果がDMSO変動の影響を受けないことを確実にするために、DMSOの最終濃度を同一レベルに調整した。

40

【0106】

生存ハエにおけるPAOの毒性を試験するために、我々は、胚段階から開始して、50、100、200、300、400、および600μMのPAOを含むハエ用栄養物で野生型ハエを培養した。200μM以下でのPAO処理は、羽化速度を変化させず、羽化後の上昇能力も変化させないことが分かった。したがって、A<sub>arc</sub>および対照ハエを培養するために、25、50、100および150μMのPAOを選択した。

【0107】

50

解剖されたショウジョウバエの第3齢幼虫におけるPAOの毒性を試験するために、50、100、200、300、400、および500nMのPAOを含有するSchneiderの培養培地を用いて、解剖したショウジョウバエの第3齢の幼虫を25℃で一晩インキュベートした。300nM以上のPAOで処理した幼虫の唾液腺細胞およびCNSニューロンは、損傷を反映して白くなったが、150nM以下のPAOではそのような影響はないことがわかった。したがって、培養のために、50、100、および150nMのPAOを選択した。

#### 【0108】

HEK293T細胞におけるPAOおよびA1の毒性を試験するために、50、100、200、300、400、および600nMのPAOまたはA1を含有するDMEM培地を用いて、HEK239細胞を12時間インキュベートした。MTT試験によれば、250nM以上のPAOまたはA1は、ほとんどの細胞を死滅させるが、150nM以下ではそのような影響はないことがわかった。したがって、培養のために、25、50、100、および150nMのPAOまたはA1を選択した。

10

#### 【0109】

マウスにおけるPAO経口胃管栄養の毒性を試験するために、PAO粉末をDMSOに溶解して、30mg/mLの原液を調製した。次いで、蒸留水で勾配希釈して所望の濃度にした；実験結果が、DMSOの変動の影響を受けないことを確実にするために、DMSOの最終濃度を同一レベルに調整した。3ヶ月齢のC57BL/6マウスを18、10および6mg/kg体重の用量で胃管栄養に付し、各用量レベルについて2匹のマウスに投与した。全てのマウスは2日目に死亡したことがわかった。次いで、マウスを4.5および2.0mg/kg体重の用量で胃管栄養に付し、各用量レベルについて5匹のマウスに投与した。4.5mg/kg体重の用量に関して、5日間連続して1日1回胃管栄養に付すると、5匹中4匹のマウスが生存した。2.0mg/kg体重の用量に関しては、毎週月曜日から金曜日まで、1日に1回胃管栄養に付し、週末は胃管栄養を行わなかった。2週間連続した後、5匹のマウスはすべて生存した。したがって、C57/B6マウスに関して、PAO胃管栄養法の致死量の中央値は2~6mg/kg体重、約4mg/kg体重である。したがって、0.1/0.3および1.0mg/kg体重投与量を、APP/PS1マウスおよび対照マウスでのPAO胃管栄養法について選択した(週1回、1週間に1回、毎週月曜日~金曜日に1日1回、週末は胃管栄養なし、6週間連続)。

20

#### 【実施例9】

#### 【0110】

RBO/PI4KIII のダウンレギュレーションは、A<sub>42</sub> 発現幼虫組織の培養によって検出されるように、A<sub>42</sub> 分泌を促進する

30

A<sub>42</sub> 発現幼虫組織の培養：

第3齢幼虫を水で洗浄し、70%アルコールで2分間滅菌し、シュナイダー(Schneider) (Sigma) 培養培地中、背側中線に沿って解剖した。幼虫の気管、腸および脂肪体を慎重に除去した。解剖された幼虫をシュナイダー培養培地で洗浄し、ゲンタマイシン(20mg/mL)を補充したSchneider培地150μLを含む2mLの遠心管に移した。各試験管には5匹の解剖された幼虫が含まれた。遠心管を25℃で8時間湿潤で暗い環境に置いた。次いで、各チューブから100μLを採取し、A<sub>42</sub>のELISA定量化に使用した。A<sub>42</sub> ヒトELISAキット(Invitrogen)を用いてELISAを行った。

#### 【0111】

40

図4において、図4a~図4cは、異なる濃度のPAO処理、rboまたはPI4KIII 遺伝子突然変異を有する解剖されたA<sub>arc</sub>発現第3齢ショウジョウバエ幼虫を培養する培地中のA<sub>42</sub>レベルの正規化された定量を示す。

#### 【0112】

PAO処理およびRBO/PI4KIII 不全が骨髄内A<sub>42</sub>蓄積を減少させるメカニズムを調べるために、Schneider培地中のA<sub>arc</sub>発現第3齢幼虫の解剖試料のインキュベーション中のA<sub>42</sub>分泌を検出した。ELISAアッセイは、PAO処理がA<sub>42</sub>分泌を促進し、薬物用量依存性の傾向を示すことを示し(図4a)、これは、PI4KIII 酵素活性の阻害がA<sub>42</sub>分泌を促進することを実証する。一致して、解剖されたA<sub>arc</sub>幼虫を培養する培地と比較して、解剖されたA<sub>arc</sub>-rboおよびA<sub>arc</sub>-PI4KIII 幼虫を培養する培地中のA<sub>42</sub>濃度は、有意に増加

50

する(図4b~4c)。

【実施例10】

【0113】

RBO/PI4KIII のダウンレギュレーションは、ヒト由来APPを発現するHEK293T細胞の培養によって検出されるように、A<sub>42</sub>分泌を促進する

ヒト由来APPを発現するHEK293T細胞の培養：

10%FBS(Gibco)、ペニシリン、ストレプトマイシン、およびG418(100 μg/mL)を補充したDMEM(Hyclone)中で、ヒトAPP(ここではHEK293T-APP細胞と称する)で安定にトランスフェクトしたHEK293T細胞を培養した。標的遺伝子の組換えプラスミドpSUPER.basic発現shRNAを、Lipofectamine(商標)2000(Invitrogen)を用いてHEK293Tに一時的にトランスフェクトした。トランスフェクション後2日間、細胞をインキュベートし、その後の実験を続けた。培地中のA<sub>42</sub>濃度のELISA定量化のために、細胞を12時間培養した後に、新たに変更された培地を試験した。

10

【0114】

HEK293T-APP細胞における、および-セクレターゼ活性およびAPP発現レベルのアッセイ：

PAOを0、25、50、100、または150nMの濃度で含有する培養液にて、HEK293T-APP細胞を12ウェルプレートでインキュベートした。6~8時間のインキュベーションの後、同じ量の細胞を別々に集めた。セクレターゼ活性を分析するために、細胞を500 μLのTBS緩衝液で別々に溶解し、15分間遠心分離し、上清を回収し、沈殿物を500 μLのTBS緩衝液で再懸濁した。およびセクレターゼの活性を分析するために、100 μLの上清を10 μMの またはセクレターゼ特異的蛍光基質を含む2x反応溶液(50mM Tris-HCl、pH6.8、4mM EDTA、0.5%CHAPSO(w/v))と混合した(Calbiochem、カタログ番号565767/565758)；-セクレターゼの活性を分析するために、100 μLの再懸濁した溶液を、10 μMのセクレターゼの特異的蛍光発生基質を含む2x反応溶液(50mM Tris-HCl、pH6.8、4mM EDTA、0.5%CHAPSO(w/v))(Calbiochem、カタログ番号565764)と混合した。37で30分間反応させた後、マイクロプレートリーダー(励起/発光： / 酵素活性について365/490nm、酵素活性について365/440)で分析する。

20

【0115】

APPの発現レベルを分析する際に、プロテアーゼ阻害剤(1%カクテル、Invitrogen)を含有するTBS緩衝液で溶解した後、回収した細胞上の抗APP/A抗体(6E10)を用いてウエスタンブロッティングを行った。

30

【0116】

図14aは、HEK293T-APP細胞の、および-セクレターゼの活性におけるPAOの効果の正規化された定量を示す。各データ点についてn=5、一元配置ANOVA分析；図14bは、異なる濃度のPAO処理後のHEK293T-APP細胞におけるAPP発現レベルを示す代表的な免疫プロットを示し、実験は3回以上繰り返された。

【0117】

このような促進が、アミロイド前駆体タンパク質(APP)の切断に由来するA<sub>42</sub>の分泌に影響するかどうかを検出するために、HEK293T-APP細胞のA<sub>42</sub>分泌を試験した。図4d~4gは、EFR3aまたはPI4KAノックダウンで、異なる濃度でのPAOおよびA1処理したHEK293T-APP細胞を培養する培地中のA<sub>42</sub>レベルの正規化された定量を示す。実際、PAO処理は、培地中のA<sub>42</sub>濃度を増加させることにおいて同様の効果を有し(図4d)、PAOはセクレターゼ阻害剤であるDAPT(1 μM)の存在下でさえ培地中のA<sub>42</sub>濃度を増加させる(図4e)。特に、PAO濃度が非常に低い(1.0nMという低さ)場合でも、PAOは依然として安定した効果を有する(図4i)。さらに、EFR3aまたはPI4KA遺伝子のノックダウンまたはHEK293T-APP細胞におけるA1処理の適用は、培地中のA<sub>42</sub>濃度を有意に増加させ得る(図4f~4g)。データの各群について、n=4~15、一元配置ANOVA分析。

40

【0118】

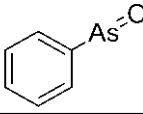
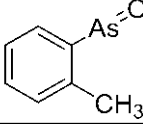
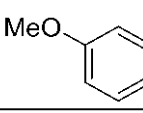
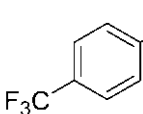
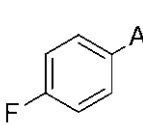
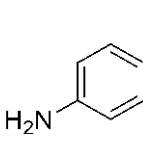
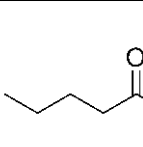
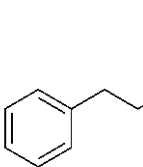
HEK293T-APP細胞で検出されたA<sub>42</sub>分泌にしたがって以下の化合物を分析したところ、

50

以下の結果が得られた：

第2表：PAO、PAO誘導体およびその活性

【表 2】

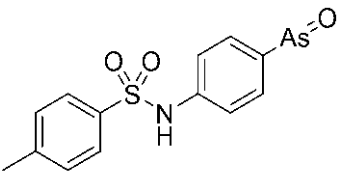
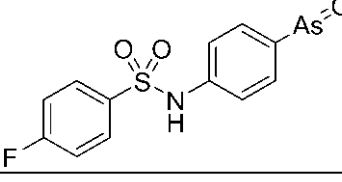
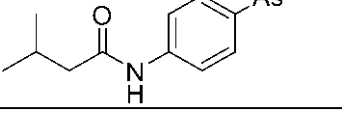
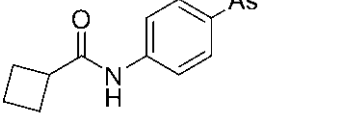
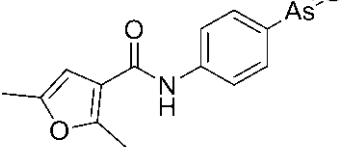
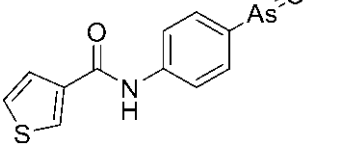
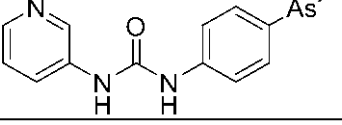
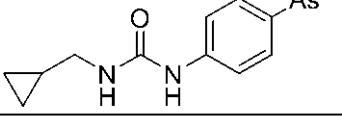
番号	化学構造	名称	Mw	活性
1		オキソ(フェニル)アルサン	168.0	+++
2		オキソ(o-トルイル)アルサン	182.1	+
3		(3-メトキシフェニル)(オキソ)アルサン	198.15	+
4		オキソ(4-(トリフルオロメチル)フェニル)アルサン	236.0	++
5		(4-フルオロフェニル)(オキソ)アルサン	186.0	++
6		4-(オキソアルサニル)アニリン (PAPAO)	183.0	++
7		N-(4-(オキソアルサニル)フェニル)ペンタンアミド	267.2	+
8		N-(4-(オキソアルサニル)フェニル)-3-フェニルプロパンアミド	315.2	+

10

20

30

【表 3】

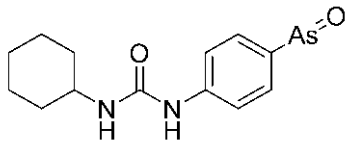
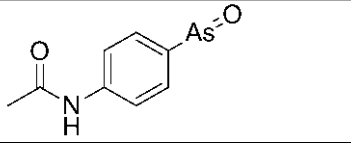
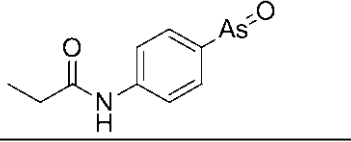
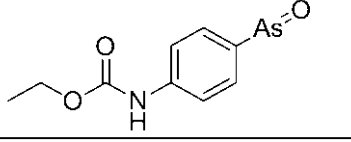
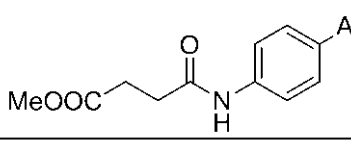
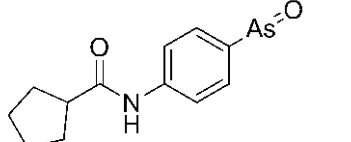
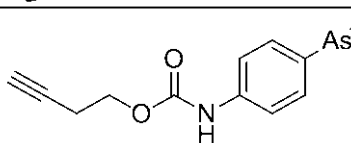
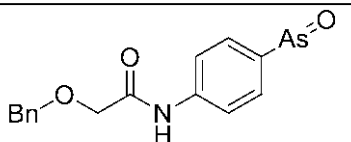
9		4-メチル-N-(4-(オキソアルサルニル)フェニル)ベンゼンスルホンアミド	337.2	+
10		4-フルオロ-N-(4-(オキソアルサルニル)フェニル)ベンゼンスルホンアミド	341.2	+
11		3-メチル-N-(4-(オキソアルサルニル)フェニル)ブタンアミド	267.2	+
12		N-(4-(オキソアルサルニル)フェニル)シクロブタンカルボキサミド	265.1	+
13		2,5-diメチル-N-(4-(オキソアルサルニル)フェニル)フラン-3-カルボキサミド	305.2	+
14		N-(4-(オキソアルサルニル)フェニル)チオフェン-3-カルボキサミド	293.2	+
15		1-(4-(オキソアルサルニル)フェニル)-3-(ピリジン-3-イル)ウレア	303.2	+
16		1-(シクロプロピルメチル)-3-(4-(オキソアルサルニル)フェニル)ウレア	280.2	+

10

20

30

【表 4】

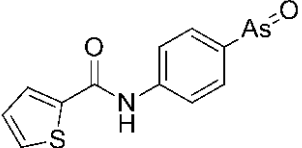
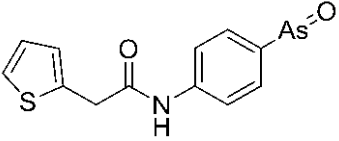
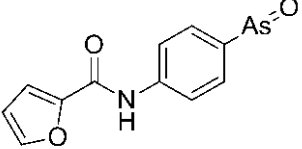
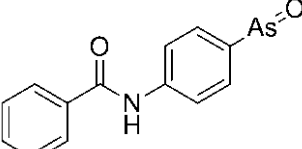
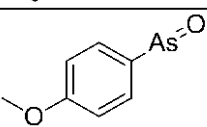
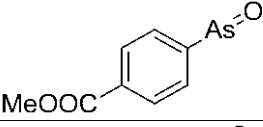
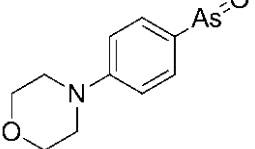
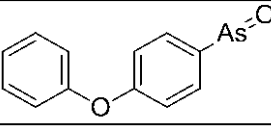
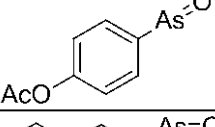
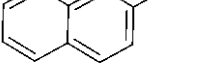
17		1-シクロヘキシル-3-(4-(オキソアルサニル)フェニル)ウレア	308.2	+
18		N-(4-アルソリルフェニル)アセトアミド	225.0	+
19		N-(4-アルソリルフェニル)プロピオンアミド	239.0	+
20		エチル(4-アルソリルフェニル)カルバメート	255.0	+
21		メチル 4-((4-アルソリルフェニル)アミノ)-4-オキソブタノエート	297.0	+
22		N-(4-アルソリルフェニル)シクロペンタンカルボキサミド	279.0	+
23		ブト-3-イン-1-イル(4-アルソリルフェニル)カルバメート	279.0	+
24		N-(4-アルソリルフェニル)-2-(ベンジルオキシ)アセトアミド	331.0	+

10

20

30

【表 5】

25		N-(4-アルソリルフェニル)チオフェン-2-カルボキサミド	292.9	+
26		N-(4-アルソリルフェニル)-2-(チオフェン-2-イル)アセトアミド	307.0	+
27		N-(4-アルソリルフェニル)フラン-2-カルボキサミド	277.0	+
28		N-(4-アルソリルフェニル)ベンズアミド	287.0	++
29		(4-メトキシフェニル)(オキシ)アルシン	198.0	++
30		メチル 4-アルソリルベンゾエート	226.0	+
31		4-(4-アルソリルフェニル)モルホリン	253.0	+
32		オキシ(4-フェノキシフェニル)アルシン	260.0	+
33		4-アルソリルフェニルアセテート	226.0	++
34		ナフタレン-2-イル(オキシ)アルシン	218.0	++

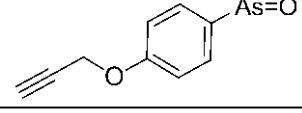
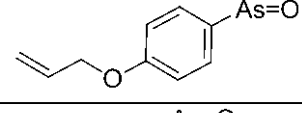
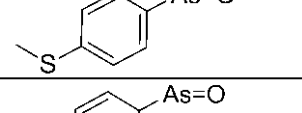
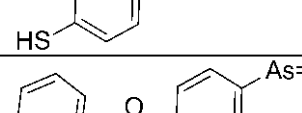
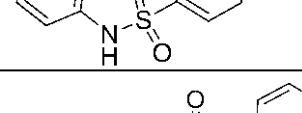
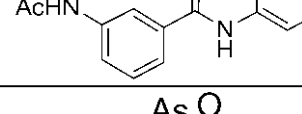
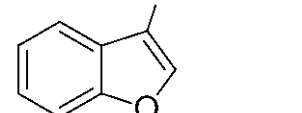
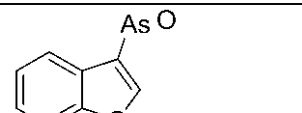
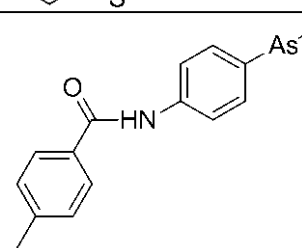
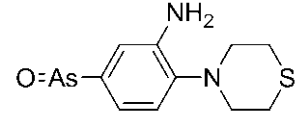
10

20

30

40

【表 6】

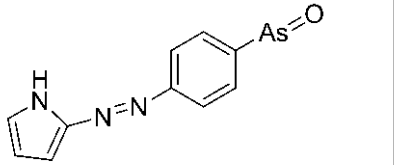
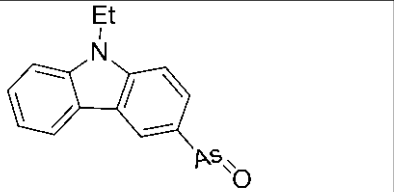
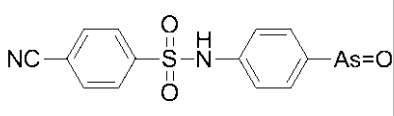
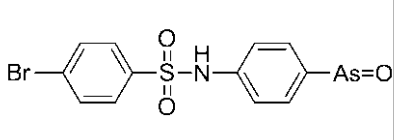
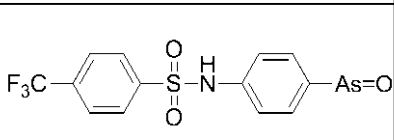
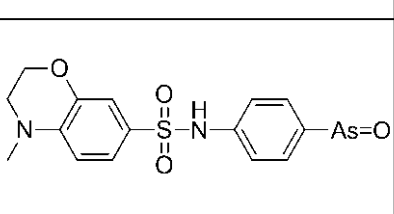
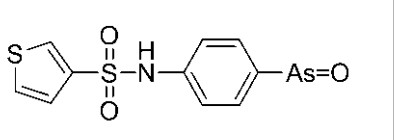
35		オキソ(4-(プロパ-2-イン-1-イルオキシ)フェニル)アルシン	222.0	+
36		オキソ(4-(プロパ-2-イン-1-イルオキシ)フェニル)アルシン	224.0	+
37		(4-(メチルチオ)フェニル)(オキソ)アルシン	213.9	+
38		4-アルソリルベンゼンチオール	199.9	+
39		4-アルソリル-N-フェニルベンゼンスルホンアミド	323.0	+
40		3-アセトアミド-N-(4-アルソリルフェニル)ベンズアミド	344.0	+
41		ベンゾフラン-3-イル(オキソ)アルシン	208.0	+
42		ベンゾ[b]チオフェン-3-イル(オキソ)アルシン	224.0	+
43		N-(4-アルソリルフェニル)-4-メチルベンズアミド	301.0	+
44		5-アルソリル-2-チオモルホリノアニリン	284.0	+

10

20

30

【表 7】

45		2-((4-アルソリルフェニル)ジアゼニル)-1H-ピロロール	261.0	+
46		3-アルソリル-9-エチル-9H-カルバゾール	285.0	+
47		N-(4-アルソリルフェニル)-4-シアノベンゼンスルホンアミド	335.9	+
48		N-(4-アルソリルフェニル)-4-ブロモベンゼンスルホンアミド	400.9	+
49		N-(4-アルソリルフェニル)-4-(トリフルオロメチル)ベンゼンスルホンアミド	300.9	+
50		N-(4-アルソリルフェニル)-4-メチル-3,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[b][1,4]オキサジーン-7-スルホンアミド	394	+
51		N-(4-アルソリルフェニル)チオフェン-3-スルホンアミド	328.9	+

10

20

30

【表 8】

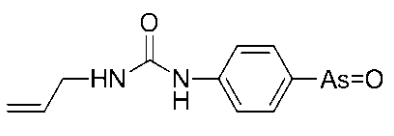
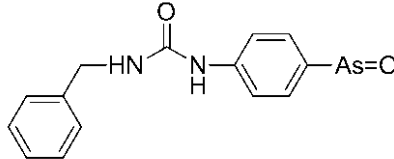
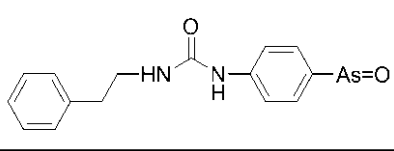
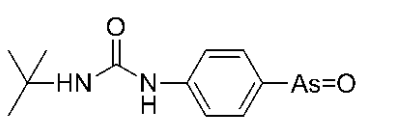
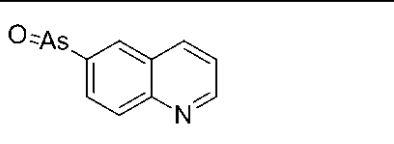
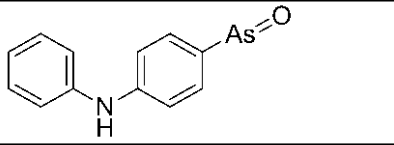
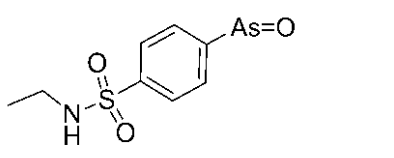
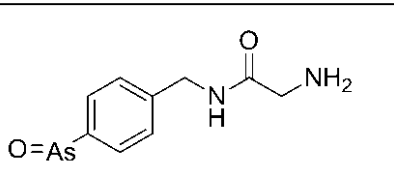
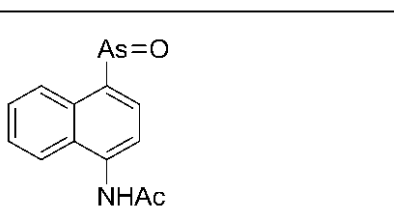
52		N-(4-アルソリルフェニル)-3,5-ジメチルイソキサゾール-4-スルホンアミド	342.0	+
53		N-(4-アルソリルフェニル)ブタン-1-スルホンアミド	303.0	+
54		N-(4-アルソリルフェニル)-4-ニトロベンゼンスルホンアミド	367.9	+
55		N-(4-アルソリルフェニル)-4-メトキシベンゼンスルホンアミド	353.0	+
56		1-(4-アルソリルフェニル)-3-(3-シアノフェニル)ウレア	327.0	+
57		1-(4-アルソリルフェニル)-3-(2-フルオロフェニル)ウレア	320.0	+
58		1-(4-アルソリルフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)ウレア	332.0	+
59		1-(4-アルソリルフェニル)-3-プロピルウレア	368.0	+
60		1-(4-アルソリルフェニル)-3-(2-ブロモエチル)ウレア	331.9	+

10

20

30

【表 9】

61		1-アリル-3-(4-アルソリルフェニル)ウレア	266.0	+
62		1-(4-アルソリルフェニル)-3-ベンジルウレア	316.0	+
63		1-(4-アルソリルフェニル)-3-フェネチルウレア	330.0	+
64		1-(4-アルソリルフェニル)-3-(tert-ブチル)ウレア	282.0	+
65		6-アルソリルキノリン	219.0	+
66		4-アルソリル-N-フェニルアニリン	259.0	+
67		4-アルソリル-N-エチルベンゼンスルホンアミド	275.0	+
68		2-アミノ-N-(4-アルソリルベンジル)アセトアミド	254.0	+
69		N-(4-アルソリルナフタレン-1-イル)アセトアミド	275.0	+

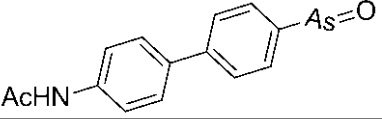
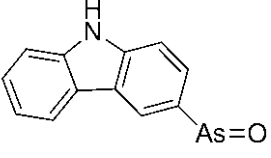
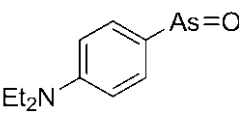
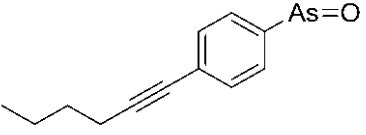
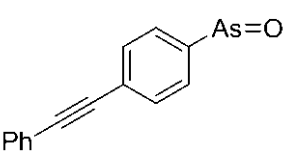
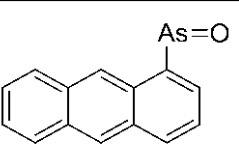
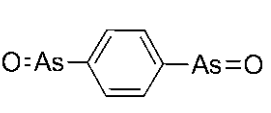
10

20

30

40

【表 10】

70		N-(4'-アルソリル-[1,1'- ビフェニル]-4-イル)アセ トアミド	301.0	+
71		3-アルソリル-9H-カルバ ゾール	257.0	+
72		4-アルソリル-N,N-ジエ チルアニリン	239.0	+
73		(4-(ヘクス-1-イン-1-イ ル)フェニル)(オキシ)アル シン	248.0	+
74		オキシ(4-(フェニルエチ ニル)フェニル)アルシン	268.0	+
75		アントラセン-1-イル(オ キシ)アルシン	268.0	++
76		1,4-ジアルソリルベンゼ ン	257.9	++

10

20

30

## 【0119】

さらに、PAOは、APPを切断するか(図14a)、またはAPPレベルを上昇させる(図4b)、およびセクレターゼの活性に影響を与えることなく、HEK293T-APP細胞におけるA<sub>42</sub>分泌を促進する。

## 【実施例11】

## 【0120】

マウスにおけるウイルス生成およびマイクロインジェクション

レンチウイルスは、EmGFPを有するBLOCK-iT(商標)HiPerform(商標)Lentiviral Pol I miR RNAi発現系を用いてInvitrogen(上海)によって産生された。Efr3aを標的とする4つのmiRNAオリゴを合成し、pcDNA(商標)6.2-GW/EmGFPmiベクターに挿入した。ノックダウン効率を、RT-PCRまたはウエスタンブロット法によって試験した。結果は、ベクターの1つが、EFR3a遺伝子を過剰発現するHEK293T細胞におけるEfr3a発現をノックダウンするのに最も有効であることを示した。最高のノックダウン効率を有するベクターの配列はAGGTATCATTCAGGTTCTGTTである。最も有効なmiRNAベクターをpDONRTM221およびpLenti6/V5 DESTと組換えて、Gateway(登録商標)組換え反応を介して、pLENT6/V5-GW / ± EmGFP-miRNAベクターを作製した。レンチウイルスは、pLENT6/V5-GW / ± EmGFP-miRNAベクターとパッケージングミックスの同時トランスフェクションによって作製された。ウイルス力価は、HEK293T細胞における連続希釈によって得られた。EGFP陽性細胞を3日ごとに数えた。レンチウ

40

50

イルスをトランスフェクトした初代海馬ニューロンにおいて、ノックダウン効率がさらに得られた。

#### 【0121】

マウス(C57BL/6およびC3H交配のF1世代)に交配することによって、雄性トランスジェニックAPP/PS1マウス(B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>, PSEN1<sup>dE9</sup>)85Dbo/Mmjax(MMRRC ID 034832-JAX))を維持した。6ヶ月齢にて、100mg/kgのケタミンと20mg/kgのキシラジンでマウスを麻酔し、電気毛布をその腹部の下に置いた定位固定装置に腹側を下に装着した。頭部の毛を除去し、皮膚を切開し、頭蓋骨に小さな穴を開けた。プレグマの後方2.1mm、側方2.3mmおよび腹側1.9mmにて、カニューレシステム(外径0.29mm、内径0.1mm、RWD Life Science Co., Ltd.)を通し、20分間以内にシリンジポンプ(Harvard Apparatus)を用いて、2 $\mu$ Lのレンチウイルス溶液(ウイルス力価:  $6 \times 10^7$ )を注入した。注射5分後に針を外して皮膚を縫合し、食餌と水を供給して25℃環境に移動させた。12ヶ月齢にて、マウスを再び麻酔し、PBS中の4%パラ-ホルムアルデヒド(PFA)を用いて心筋灌流に付した。実験では、動物の使用に関する米国神経科学学会の方針を遵守した。

10

#### 【実施例12】

#### 【0122】

EFR3aノックダウンは、マウス脳切片におけるGFP染色によって試験されるように、APP/PS1マウスの神経樹状突起の萎縮を修復する可能性がある。

マウス脳切片におけるGFP染色:

脳スライス(厚さ60 $\mu$ m)をPBS-0.3%トリトン-5%BSAで1時間ブロックした後、ウサギ抗GFP抗体(A11122、Invitrogen、1:100希釈)と共に4℃で一晩インキュベートした。次に、PBSで洗浄し、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体(H+L)(AbboMax、Inc、1:100希釈)と共に4℃で一晩インキュベートする。PBSで再度洗浄し、Cy3-ストレプトアビジン(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc、1:1000希釈)と共に室温で2時間インキュベートする。画像を、Zeiss LSM 511共焦点顕微鏡で撮影し、AutoQuant X2でデコンボリューションし、NeuronStudioソフトウェアで解析した。脳スライスの遺伝子型および樹状突起の画像は、それぞれ撮像および分析担当者にはブラインドであった。

20

#### 【0123】

図11において、HEK293細胞における内部EFR3a(a)およびPI4KA遺伝子(b)、HEK293細胞における過剰発現マウスEFR3a-gfp組換え遺伝子(c)およびマウスの初代海馬ニューロンにおける内部Efr3a遺伝子(d)のノックダウン効率を解析するために、RT-PCRを採用した。代表的な画像を上段に示し、正規化された定量を下段に示す。Efr3aおよびPI4KA遺伝子ノックダウンRNAiを構築するために使用される配列は、5'-GGTTATTGAAATTCGAACT-3'(配列番号:5)および5'-TGCTCATTAGCAGTAAAGA-3'(配列番号:6)である。各データについて、n=3~5であり、P値を得るためにt検定を行った。

30

#### 【0124】

図5aにおいて、共焦点画像は、抗GFP免疫染色された全海馬スライス(上段)およびCA3セグメントにおけるレンチウイルスでトランスフェクトされたピラミッド細胞を(下段)に示す。樹状突起直径および棘密度の定量のために約30 $\mu$ mの樹状突起断片を選択した。スケールバーは、それぞれ500 $\mu$ m(上部)および50 $\mu$ m(下部)を表す。APP/PS1マウスおよび対照同腹子のCA3セグメントピラミッドニューロン(図5b)およびCA3セグメント顆粒ニューロン(図5c)において、EFR3a遺伝子ノックダウンは樹状突起直径および棘密度に影響を及ぼす。CA3およびDGセグメントデンドライトの代表的な画像は上段であり、樹状突起直径および棘密度の定量は、下段である。各データポイントは、3~4匹の動物のn=25スライスから得られ、P値は一元配置ANOVA分析によって得られた。図5b~5cにおいて、スケールバーは1.0 $\mu$ mを表す。

40

#### 【0125】

マウスおよびヒトは、ADに非常に感受性がある海馬および同様の領域(Allen Brain Atlas)において富んでいる、2つのrboホモログであるEFR3aおよびEFR3bを有する。我々は、EGFP標識RNAi法を用いて、EFR3a遺伝子のダウンレギュレーションがAPP/PS1マウスの海馬

50

ニューロンを保護することができるかどうかを調べた。RNAiノックダウン効率を図11a~11bに示した。共焦点イメージングは、EGFP発現レンチウイルスがCA3およびDGセグメント中の少数のニューロンに感染することを明らかにした(図11a)。共焦点イメージングは、EGFP発現レンチウイルスがCA3およびDGセグメント中の少数のニューロンに感染することを明らかにした(図11a)。樹状突起直径および棘密度を、二次頂点樹状突起のランダムに選択した近位セグメント(長さ~30 $\mu$ m)で測定した。対照レンチウイルスに感染したAPP/PS1マウスのCA3およびDGセグメントニューロンの両方の2つのパラメータの値は、野生型対照マウスおよびAPP/PS1マウスのそれより有意に減少し(図5b~5c)、APP/PS1マウスにおける海馬ニューロンの樹状突起および脊髄の萎縮を示す。APP/PS1マウス間で比較すると、RNAiレンチウイルスに感染したニューロンにおいて2つのパラメータの値は有意に増加し、野生型マウスの値と有意差はない(図5b~5c)。したがって、APP/PS1マウスの海馬ニューロンにおけるrbo相同体EFR3aのダウンレギュレーションも、ニューロンを保護する。

10

### 【実施例13】

#### 【0126】

PAOは学習および記憶を改善し、CSF中のA<sub>42</sub>を増加させるが、CSFおよび分画したマウス脳の膜の組成分析によって検出されるAPP/PS1マウスの脳膜中のA<sub>42</sub>を減少させる。

脳脊髄液の採取：

マウスをケタミンおよびキシラジンで麻酔し、頭部アダプターで固定した。頸部の皮膚を剃毛して切開し、その下にある皮下組織と筋肉を鉗子で側方に分離して、大槽上部の硬膜を露出させた。硬膜を貫通するために、マイクロインジェクションシリンジに接続された平滑末端を備えたシャープチップのガラスキャピラリーを使用した。キャピラリー管挿入への抵抗の顕著な変化に続いて、キャピラリー管を大槽に入れ、約10-20 $\mu$ Lが採取されるまで、CSFをキャピラリー管に流入させた。採取したCSFをエッペンドルフチューブに移し、使用するまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

20

#### 【0127】

マウス脳膜の分画：

連続抽出により界面活性剤可溶性A<sub>42</sub>を得る。トリス緩衝化生理食塩水(TBS)のマウス脳半球の5倍量を添加して、磨り潰して、ホモジナイズし、100,000gで60分間遠心分離し、上清をTBS抽出物とした。沈殿物を回収し、磨り潰すために、1%ポリエチレングリコールオクチルフェノールエーテルを含有する5倍量のTBSに添加し、遠心分離し、上清をTBS-トリトン抽出物とした。沈殿物を再び回収し、磨り潰すために、1%SDSを含む5倍量のTBSに添加し、遠心分離し、上清をTBS-SDS抽出物とした。3つの上清すべてを集め、アリコートに分け、ELISAアッセイのために-80 $^{\circ}$ Cの冷蔵庫に保存した。

30

#### 【0128】

培養細胞およびヒトにおける前述の結果は、PAOがA<sub>42</sub>分泌を促進し、ニューロン内のA<sub>42</sub>の蓄積を減少させ、およびシナプスの不全を改善することを実証し、このことは、PAOが、A<sub>42</sub>分泌を促進することによってADを治療するための潜在的な薬物であることを示している。これを試験するために、本発明者らは、異なる用量でPAOを経口投与したAPP/PS1マウスで行動および生化学実験を行った。

40

#### 【0129】

図6aは、異なる用量にてPAOで処置したAPP/PS1マウス(左)および野生型同腹子(右)のモリス水迷路訓練曲線を示す。比較のために、0 PAOを投与したAPP/PS1マウスの学習曲線を左および右のグラフの両方に示した。図6bは、訓練後の対照およびAPP/PS1マウスの全探索時間に対する標的象限で費やされた探索時間のパーセンテージを示す。ELISA定量を用いて、異なるPAO濃度で処理したAPP/PS1マウスのCSF(図6c)および1%Tritonおよび1%SDSを含むTBSで抽出した分画した脳膜(図6d)のA<sub>42</sub>レベルを分析した。図6eは、APP/PS1マウスのCSF(左)および1%SDS含有TBS抽出分画脳膜(右)のELISA定量における、測定したA<sub>42</sub>値における100 $^{\circ}$ Cでの熱処理時間の影響を示す。図6fは、100 $^{\circ}$ Cで60分間の熱処理後に、1%Tritonおよび1%SDSを含むTBSで抽出した分画した脳膜のELISA定量におけるA

50

$A_{42}$ レベルを示す。図6gは、 $A_{42}$ を合計するために、1%トリトンおよび1%SDSを含有するTBSで抽出した分画した脳膜において、100 で60分間の熱処理後に放出された $A_{42}$ の百分率を示す。図6a~6bでは、野生型対照について、 $n=6\sim 8$ であり、各APP/PS1群について、 $n=7\sim 8$ である。図6eでは、左側グラフでは、 $n=3$ であり、右側グラフでは、 $n=23$ である。図6c、6dおよび6fにおいて、 $n=5-6$ である。すべてのP値は一元配置ANOVA分析によって得られた。

#### 【0130】

実施例8に記載した野生型マウスにおけるPAO胃管栄養の毒性を調べたように、濃度勾配0、0.1、0.3および1.0mg/kgで以下の実験を行った。4ヶ月齢のAPP/PS1マウスおよび野生型マウスを、毎週月曜日~金曜日に6回連続して1日1回、PAO胃管栄養に付した。その後、PAOの投与を1週間中止し、Vorhees and Williamsによる水迷路実験によってマウスの学習能力と記憶能力を試験した。野生型対照と比較して、PAO処置なしのAPP/PS1マウスは、空間学習および記憶能力の障害を示した(図6a~6b)。この障害は、PAO処置APP/PS1マウスにおいて、最も顕著には0.3mg/kgの用量で有意に減少した(図6a~6b)。この結果は、PAOが、APP/PS1マウスにおける学習および記憶機能不全の治療に使用できることを示している。行動試験後、CSFを採取し、各APP/PS1マウスから脳膜分画を抽出した。ELISA定量アッセイのために、脳を、1%Triton X-100または1%SDSを含む2つのTBS緩衝液での膜結合 $A_{42}$ を抽出するための分画に付した。PAOが、CSFに含まれる $A_{42}$ レベルを増加させ(図6c)、意外にも脳膜の $A_{42}$ レベルを0.3mg/kgの用量で最も顕著に増加させることが判明した(図6d)。しかしながら、図6fは、PAO処理が、最も顕著には0.3mg/kgの用量で、脳膜における凝集した $A_{42}$ レベルを減少させることを示す。

#### 【実施例14】

#### 【0131】

PI4KIII 突然変異は、水迷路実験によって試験されるように、APP/PS1マウスの学習および記憶障害を改善する。

PI4KIII 発現レベルの遺伝的ダウンレギュレーションまたは $A_{42}$ 発現ハエのPAOによるその酵素活性の阻害は両方とも、神経機能不全を改善する；APP/PS1マウスにおけるPAOによるPI4KIII 酵素活性の阻害はまた、学習および記憶能力を改善する。APP/PS1マウスの神経変性におけるPI4KIIIaの役割をさらに明らかにするために、APP/PS1マウスの水迷路実験におけるPI4KIII (Pi4ka<sup>Gt(RR0073)</sup>Byg/+；トランスポゾンpGT2LxfをPI4KA遺伝子の1コピーに挿入すると、遺伝子コピーの転写が妨げられることがあり、得られたmRNAは、PI4KIII のN末端上の第1~265アミノ酸によって形成された切断タンパク質およびレポーター遺伝子によってコードされるタンパク質のみを翻訳する可能性がある)のヘテロ接合突然変異の影響を調べた。Pi4ka<sup>Gt(RR0073)</sup>Byg/+突然変異ヘテロ接合体(MMRRC、カタログ#016351-UCD)をAPP/PS1マウスと交配させて、4つの群の遺伝子型マウスを得た：野生型(WT)、PI4KIIIa突然変異ヘテロ接合体(PI4K\*/+)、APP/PS1(TG)およびPI4KIIIaヘテロ接合突然変異を有するAPP/PS1(TG;PI4K\*/+)。4つの群のマウスが5ヶ月齢に達したとき、Vorhees and Williamsに従って水迷路実験を行った。図12に示すように、PI4KIIIaヘテロ接合突然変異は、5ヶ月齢のAPP/PS1マウスの空間学習および記憶能力を有意に改善することができる。図12の左側は、4つの群の遺伝子型マウスの訓練日における逃避潜時および学習曲線を示し、図12の右側は、4つの群の遺伝子型マウスの訓練1日後の最初の日の合計時間に対する標的象限における遊泳時間の百分率を示す。

#### 【実施例15】

#### 【0132】

リボソーム実験により試験された、リボソームでの $A_{42}$ 凝集/オリゴマー化におけるPI<sub>4</sub>P、PI<sub>4,5</sub>Pの影響

リボソーム実験：

1)合成 $A_{42}$ を1:1(mg:mL)の比率でヘキサフルオロ-2-プロパノール(HFIP)で溶解し、次いで、室温で15分間超音波処理して均質化する。超音波発生器は、KUDOS超音波装置(モデルSK250HP)である。

10

20

30

40

50

2) 脂質(第2表)をクロロホルムで別々に溶解して、1:1(mg:mL)の比率でリポソームを生成するために使用される脂質(第1表)を調製し、次いで、室温で15分間超音波処理して均質化する。

3) 第2表に示す組成に従って脂質を混合した後、有機溶媒を凍結乾燥機で溶液から除去する。

4) 凍結乾燥後、沈殿物を1.0mLトリス緩衝液(50mM Tris、120mM NaCl、pH7.0)で再懸濁し、次いで、氷水中で30分間超音波処理して均質化する。イムノプロット分析のために4で48時間静置する(一次抗体は、抗ヒト化A<sub>42</sub>モノクローナル抗体6E10、1:1000希釈)。イムノプロット分析の前に、15分間の超音波処理が均質化のために必要である。

【0133】

第3表：リポソーム製剤の組成

【表11】

	CAS #	Mw	モル%	体積
ホスファチジルセリン(PS)	145849-32-7	757.95	8.9	68 $\mu$ L
ホスファチジルコリン(PC)	63-89-8	734.04	15.4	121 $\mu$ L
ホスファチジルエタノールアミン(PE)	1069-79-0	748.07	26.5	196 $\mu$ L
コレステロール(CH)	57-88-5	386.65	14.8	57 $\mu$ L
スフィンゴミエリン(SM1)	85187-10-6	973.55	8.9	86 $\mu$ L
			最終濃度	
A $\beta$ <sub>42</sub>		4514.04	1.0 $\mu$ M	4.5 $\mu$ L
PI(diC16)	119943-95-2	833.01	20 $\mu$ M	17 $\mu$ L
PI <sub>4</sub> P(diC16)	214332-61-3	956.96	20 $\mu$ M	19 $\mu$ L
PI <sub>4,5</sub> P(diC16)	120595-88-2	1080.9	20 $\mu$ M	22 $\mu$ L

【0134】

リポソーム中のA<sub>42</sub>のオリゴマー化におけるPI、PI<sub>4</sub>P、PI<sub>4,5</sub>Pの効果を分析し、比較した。図13において、左の列は、PI<sub>4</sub>Pがリポソーム中のA<sub>42</sub>の濃度依存的なオリゴマー化を促進することを示し、ここで、上段および下段は、それぞれ短時間および長時間の光曝露下の同じイムノプロット膜の結果であり、80  $\mu$ MのPI<sub>4</sub>P濃度では、40  $\mu$ Mの濃度と比較して、A<sub>42</sub>のオリゴマー化に対する促進効果が減少することが注目される。図13の右の列は、リポソーム中のA<sub>42</sub>凝集におけるPI、PI<sub>4</sub>P、およびPI<sub>4,5</sub>Pの促進効果を示し、ここで、上段および下段は、それぞれ短時間および長時間の光曝露下の同じイムノプロット膜の結果であり、PI<sub>4</sub>Pの効果は、PIおよびPI<sub>4,5</sub>Pよりも有意に強力であるが、A<sub>42</sub>三量体以上のオリゴマー化におけるPI<sub>4</sub>Pの促進効果は、PIおよびPIP<sub>2</sub>のものよりも強いことが注目される。

【実施例16】

【0135】

細胞膜上のRBO/EFR3/EFR3A/EFR3B、PI4KIIIa、およびTTC7の複合体形成

酵母EFR3タンパク質は、細胞膜上にPI4KIIIa および足場タンパク質YYP1と複合体(2つの相同体TTC7AおよびTTC7Bを含み、哺乳類においてTC7と称される)を形成し、PIKパッチとして凝集し、細胞膜PI<sub>4</sub>PレベルおよびPI<sub>4,5</sub>Pレベルさえも共に調節することが報告されている。YYP1は、酵母PI4KIIIaタンパク質のN末端および中央領域と直接相互作用し、し

10

20

30

40

50

たがって、PIKパッチの構築および安定化に重要な役割を果たす(Baird D、Stefan C、et al.、2008、J Cell Biol)。PIKパッチの形成および機能もまた、哺乳類細胞において保存的である(Nakatsu F、Baskin JF、et al.、2012、J Cell Biol)。ハエにおけるTTC7のショウジョウバエ相同体は、致死(2) k14710(1(2) k14710) 遺伝子によってコードされる。

【 0 1 3 6 】

神経細胞内A<sub>arc</sub>蓄積によって引き起こされる神経変性におけるTTC7タンパク質の役割を試験するために、2つのトランスポゾン媒介導入遺伝子をA<sub>arc</sub>ハエに導入した。1(2) k14710遺伝子の転写を防止するために、1(2) k14710遺伝子の第1エクソンに、P{lacW}1(2)k14710k<sup>15603</sup>トランスポゾン(ブルーミントンカタログ#11134)を挿入した；もう1つはP{EPgy2}bin3<sup>EY09582</sup>(ブルーミントンストック#20043)である。この実験では、4つの群のハエを構築した：対照ハエ(ctrl)、A<sub>arc</sub>ハエ(A<sub>arc</sub>)、P{lacW}1(2)k14710k<sup>15603</sup>の1コピーを有するA<sub>arc</sub>ハエ(A<sub>arc</sub>-dttc7<sup>+/-</sup>、TTC7ダウンレギュレーション)およびP{EPgy2}bin3<sup>EY09582</sup>の1コピーを有するA<sub>arc</sub>ハエ(A<sub>arc</sub>-dttc7-OE、TTC7過剰発現)。4つの群の成体のハエが、5-10日齢および30-35日齢に達したとき、100Hzの脳刺激下でGF経路におけるEJPの記録が行われた。

10

【 0 1 3 7 】

図15は、A<sub>arc</sub>ハエの神経伝達におけるttc7ダウンレギュレーションおよび過剰発現の効果の定量分析を示す。5-10日齢では、100Hzの脳刺激誘発性神経伝達の成功率に有意差はない；しかしながら、30-35日齢では、A<sub>arc</sub>ハエの成功率は、対照ハエ(ctrl)よりも有意に低く、TTC7過剰発現(A<sub>arc</sub>-dttc7-OE)は、成功率をさらに低下させ、一方、TTC7

20

【 0 1 3 8 】

本発明を実施するための好ましい実施態様は、本明細書に記載される。本発明は、上記実施態様に限定されるものではない。任意の変形、修正、置換、組み合わせ、および単純化が、本発明の真の趣旨および原理から逸脱することなく、本発明の等価物に属し、本発明の保護の範囲内に包含される。

【 図 1 】

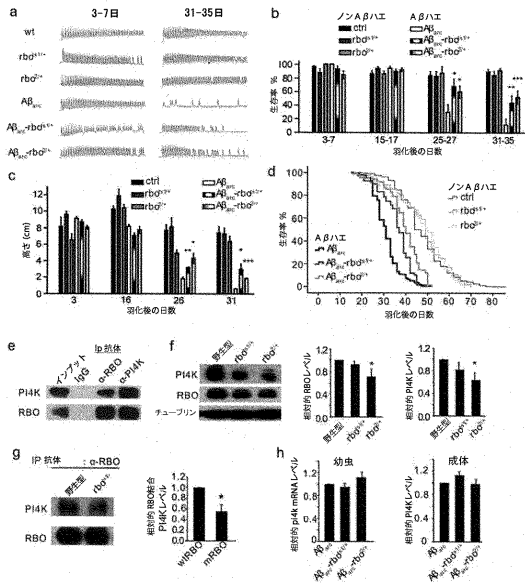


Fig. 1

【 図 2 】

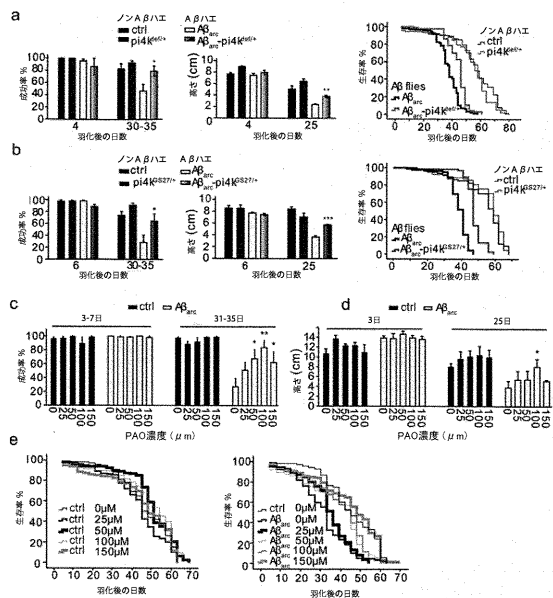


Fig. 2

【 図 3 】

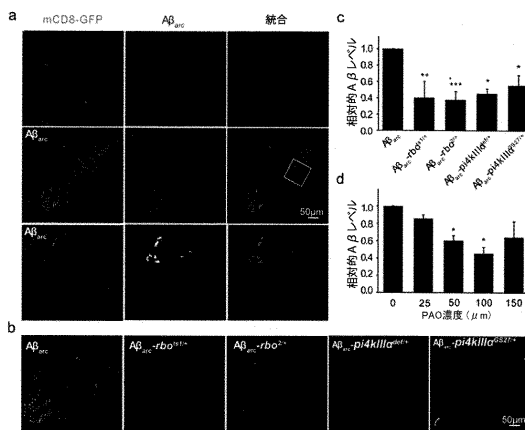


Fig. 3

【 図 4 】

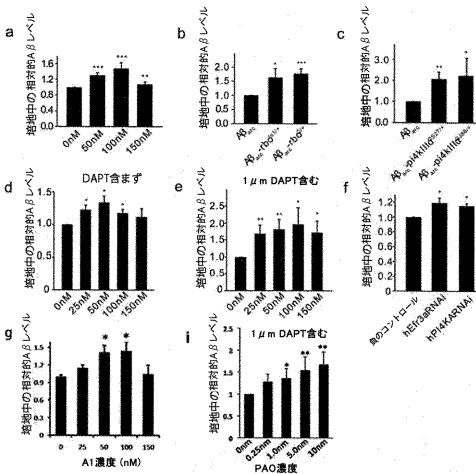


Fig. 4

【 図 5 】

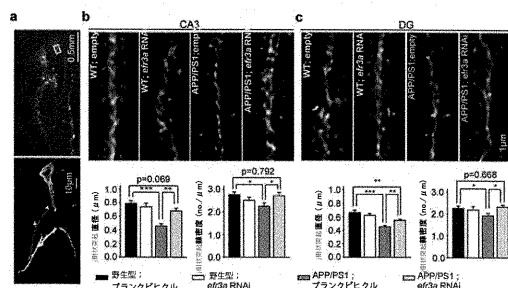


Fig. 5

【 図 6 】

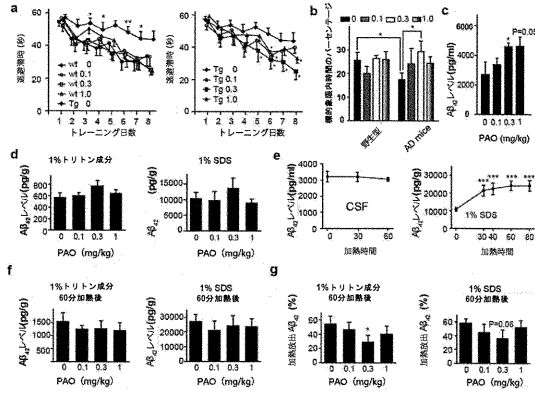


Fig. 6

【 図 7 】

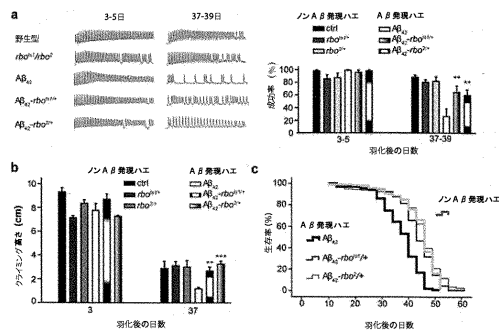


Fig. 7

【 図 10 】

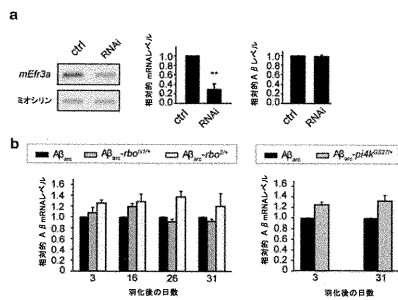


Fig. 10

【 図 11 】

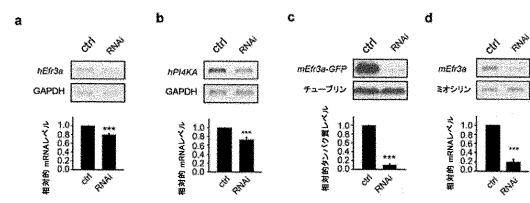


Fig. 11

【 図 12 】

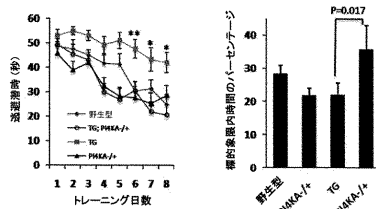


Fig. 12

【 図 8 】

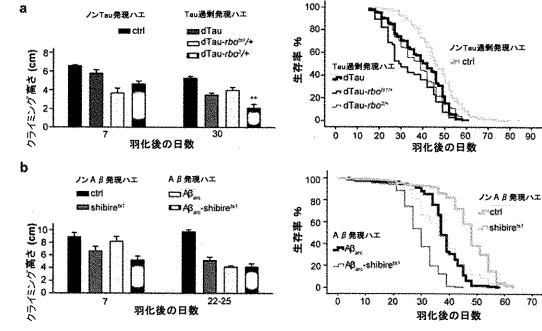


Fig. 8

【 図 9 】

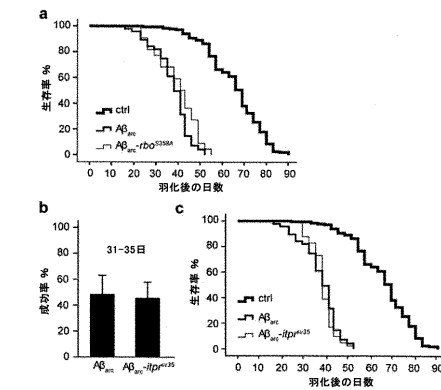


Fig. 9

【 図 13 】

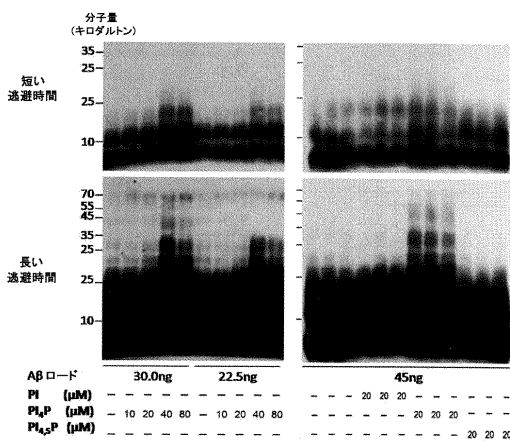


Fig. 13

【 図 14 】

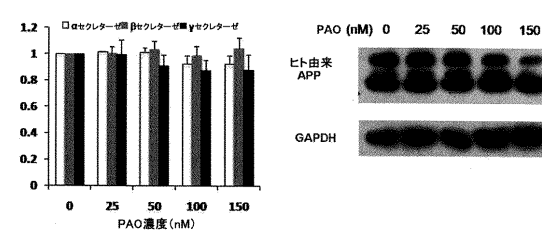


Fig. 14

【 図 1 5 】

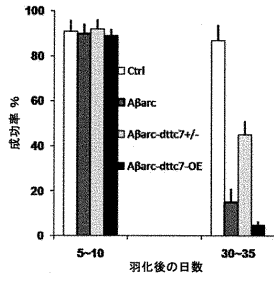


Fig.15

【 配 列 表 】

2018520367000001.app

## 【 国際調査報告 】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2015/078070****Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
  - a. (means)
    - on paper
    - in electronic form
  - b. (time)
    - in the international application as filed
    - together with the international application in electronic form
    - subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/CN2015/078070</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12Q 1/68 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, embase, ISI web of Knowledge: cell membrane, screen, secretion, neuron, AD, alzheimer, membrane, drosophila, APP, A $\beta$ , TTC7, RBO		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103529182 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 22 January 2014 (22.01.2014), abstract, claims 1-11, and description, paragraphs 0002-0007, 0089 and 0093	1-6
A	CN 104046676 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 17 September 2014 (17.09.2014), the whole document	1-6
A	CN 102265806 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 07 December 2011 (07.12.2011), the whole document	1-6
A	CN 1329674 A (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH), 02 January 2002 (02.01.2002), the whole document	1-6
A	CN 1339066 A (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY), 06 March 2002 (06.03.2002), the whole document	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "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 21 January 2016 (21.01.2016)	Date of mailing of the international search report <b>04 February 2016 (04.02.2016)</b>	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer  <b>WU, Li</b>  Telephone No.: (86-10) <b>62411046</b>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2015/078070**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103529182 A	22 January 2014	None	
CN 104046676 A	17 September 2014	None	
CN 102265806 A	07 December 2011	WO 2011140997 A1	17 November 2011
		CN 102265806 B	25 December 2013
CN 1329674 A	02 January 2002	CN 1261589 C	28 June 2006
		US 7109027 B2	19 September 2006
		DE 19856261 C1	30 March 2000
		WO 0034511 A2	15 June 2000
		DE 59914752 D1	19 June 2008
		JP 4594529 B2	08 December 2010
		CA 2354154 A1	15 June 2000
		WO 0034511 A3	16 November 2000
		EP 1137810 A2	04 October 2001
		JP 2002531141 A	24 September 2002
		AT 394505 T	15 May 2008
		AU 766751 B2	23 October 2003
		ZA 200104490 A	04 June 2002
		US 2001034884 A1	25 October 2001
		EP 1137810 B1	07 May 2008
		BR 9915982 A	11 September 2001
		AU 1968000 A	26 June 2000
		HK 1041714 A1	17 November 2006
		CA 2354154 C	04 January 2011
CN 1339066 A	06 March 2002	ES 2318902 T3	01 May 2009
		KR 100768381 B1	18 October 2007
		IL 182070 D0	24 July 2007
		SK 3902001 A3	03 December 2001
		EP 1115874 B1	07 January 2009
		PL 348629 A1	03 June 2002
		KR 100691601 B1	09 March 2007
		CN 1502697 A	09 June 2004
		AU 2004203588 A1	02 September 2004
		PL 205294 B1	31 March 2010
		CN 1502692 A	09 June 2004
		DE 69940265 D1	26 February 2009
		NZ 527053 A	29 April 2005
		AU 772812 B2	06 May 2004
		AU 6141899 A	10 April 2000
		CY 1111006 T1	11 June 2015
		CZ 20010966 A3	17 October 2001
		HK 1042730 A1	18 November 2005
		IL 142207 A	30 November 2010
		NO 20011505 A	23 May 2001
		JP 2009201517 A	10 September 2009
		SG 113454 A1	29 August 2005
		KR 20070013361 A	30 January 2007
		WO 0017369 B1	28 December 2000
		ZA 200102387 A	23 September 2002
		EA 009216 B1	28 December 2007
		CN 1300320 C	14 February 2007

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2015/078070**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		KR 20060111905 A	30 October 2006
		KR 20060126626 A	07 December 2006
		CN 1502696 A	09 June 2004
		EP 1115874 A2	18 July 2001
		NO 20011505 D0	23 March 2001
		AT 420185 T	15 January 2009
		KR 20040097216 A	17 November 2004
		KR 20040093193 A	04 November 2004
		CN 1198936 C	27 April 2005
		BR 9913920 A	06 November 2001
		TR 200101484 T2	21 June 2002
		PT 1115874 B	09 April 2009
		AU 772812 C	09 December 2004
		KR 20070004143 A	05 January 2007
		TR 200601231 T2	21 September 2006
		JP 2002526081 A	20 August 2002
		KR 20040099362 A	26 November 2004
		HU 0103838 A3	29 May 2006
		HK 1062187 A1	22 June 2007
		CA 2343004 A1	30 March 2000
		TR 200200662 T2	21 June 2002
		IS 5905 A	22 March 2001

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2015/078070
A. 主题的分类 C12Q 1/68(2006.01)i  按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12Q  包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献  在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, embase, ISI web of Knowledge: 细胞膜, 筛选, 果蝇, 阿尔茨海默, 分泌, 神经元, AD, alzheimer, membrane, drosophila, APP, A $\beta$ , TTC7, RBO		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 103529182 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 1月 22日 (2014 - 01 - 22) 说明书摘要, 权利要求1-11, 说明书第0002-0007, 0089, 0093段	1-6
A	CN 104046676 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 全文	1-6
A	CN 102265806 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2011年 12月 7日 (2011 - 12 - 07) 全文	1-6
A	CN 1329674 A (阿文蒂斯药物德国有限公司) 2002年 1月 2日 (2002 - 01 - 02) 全文	1-6
A	CN 1339066 A (法玛西雅厄普约翰美国公司) 2002年 3月 6日 (2002 - 03 - 06) 全文	1-6
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2016年 1月 21日		国际检索报告邮寄日期 2016年 2月 4日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 吴立 电话号码 (86-10)62411046

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/078070

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	103529182	A	2014年 1月 22日	无	
CN	104046676	A	2014年 9月 17日	无	
CN	102265806	A	2011年 12月 7日	WO 2011140997 A1	2011年 11月 17日
				CN 102265806 B	2013年 12月 25日
CN	1329674	A	2002年 1月 2日	CN 1261589 C	2006年 6月 28日
				US 7109027 B2	2006年 9月 19日
				DE 19856261 C1	2000年 3月 30日
				WO 0034511 A2	2000年 6月 15日
				DE 59914752 D1	2008年 6月 19日
				JP 4594529 B2	2010年 12月 8日
				CA 2354154 A1	2000年 6月 15日
				WO 0034511 A3	2000年 11月 16日
				EP 1137810 A2	2001年 10月 4日
				JP 2002531141 A	2002年 9月 24日
				AT 394505 T	2008年 5月 15日
				AU 766751 B2	2003年 10月 23日
				ZA 200104490 A	2002年 6月 4日
				US 2001034884 A1	2001年 10月 25日
				EP 1137810 B1	2008年 5月 7日
				BR 9915982 A	2001年 9月 11日
				AU 1968000 A	2000年 6月 26日
				HK 1041714 A1	2006年 11月 17日
				CA 2354154 C	2011年 1月 4日
CN	1339066	A	2002年 3月 6日	ES 2318902 T3	2009年 5月 1日
				KR 100768381 B1	2007年 10月 18日
				IL 182070 D0	2007年 7月 24日
				SK 3902001 A3	2001年 12月 3日
				EP 1115874 B1	2009年 1月 7日
				PL 348629 A1	2002年 6月 3日
				KR 100691601 B1	2007年 3月 9日
				CN 1502697 A	2004年 6月 9日
				AU 2004203588 A1	2004年 9月 2日
				PL 205294 B1	2010年 3月 31日
				CN 1502692 A	2004年 6月 9日
				DE 69940265 D1	2009年 2月 26日
				NZ 527053 A	2005年 4月 29日
				AU 772812 B2	2004年 5月 6日
				AU 6141899 A	2000年 4月 10日
				CY 1111006 T1	2015年 6月 11日
				CZ 20010966 A3	2001年 10月 17日
				HK 1042730 A1	2005年 11月 18日
				IL 142207 A	2010年 11月 30日
				NO 20011505 A	2001年 5月 23日
				JP 2009201517 A	2009年 9月 10日
				SG 113454 A1	2005年 8月 29日
				KR 20070013361 A	2007年 1月 30日
				WO 0017369 B1	2000年 12月 28日
				ZA 200102387 A	2002年 9月 23日
				EA 009216 B1	2007年 12月 28日
				CN 1300320 C	2007年 2月 14日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/078070

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		KR 20060111905 A	2006年 10月 30日
		KR 20060126625 A	2006年 12月 7日
		CN 1502696 A	2004年 6月 9日
		EP 1115874 A2	2001年 7月 18日
		NO 20011505 D0	2001年 3月 23日
		AT 420185 T	2009年 1月 15日
		KR 20040097215 A	2004年 11月 17日
		KR 20040093193 A	2004年 11月 4日
		CN 1198936 C	2005年 4月 27日
		BR 9913920 A	2001年 11月 6日
		TR 200101484 T2	2002年 6月 21日
		PT 1115874 E	2009年 4月 9日
		AU 772812 C	2004年 12月 9日
		KR 20070004143 A	2007年 1月 5日
		TR 200601231 T2	2006年 9月 21日
		JP 2002526081 A	2002年 8月 20日
		KR 20040099362 A	2004年 11月 26日
		HU 0103838 A3	2006年 5月 29日
		HK 1062187 A1	2007年 6月 22日
		CA 2343004 A1	2000年 3月 30日
		TR 200200662 T2	2002年 6月 21日
		IS 5905 A	2001年 3月 22日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 25/28 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/28	
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/15	Z
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
<b>G 0 1 N 33/543 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/543	5 7 5

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 黄 福德

中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江高科技園區海科路 9 9 号

(72)発明者 張 瀟

中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江高科技園區海科路 9 9 号

(72)発明者 王 文安

中華人民共和国 2 0 0 0 9 2 上海市楊浦区控江路 1 6 6 5 号

(72)発明者 劉 海燕

中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江高科技園區海科路 9 9 号

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA36 FB01 FB03 FB13

4B063 QA18 QA20 QQ08 QQ13 QQ61 QQ79 QR41 QR48 QR77 QR80

QS33 QS38 QX01 QX02

4C084 AA17 NA20 ZA16