

(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
2022年4月7日(07.04.2022)



(10) 国際公開番号

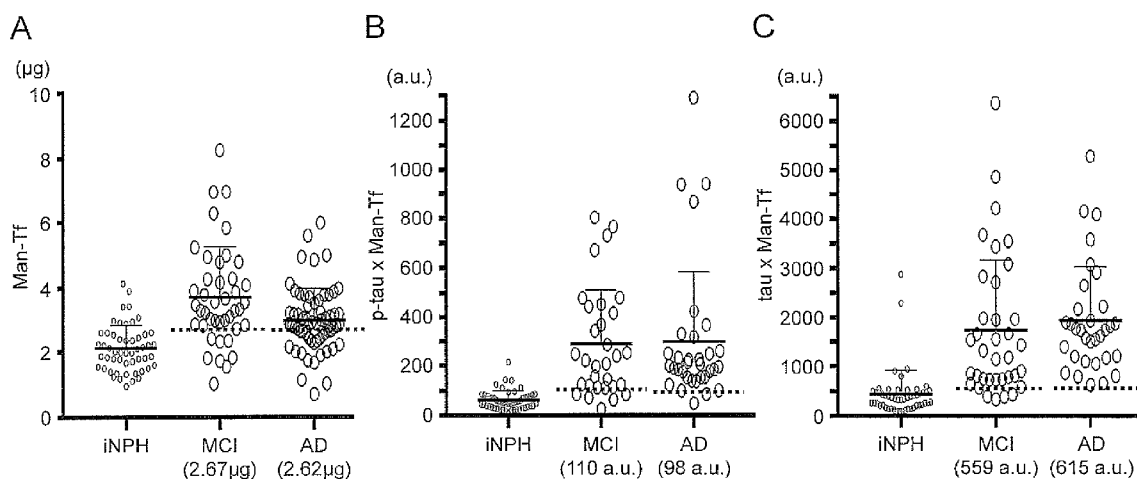
WO 2022/070798 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/47 (2006.01) C12N 9/90 (2006.01)
C07K 14/79 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01) G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/032787
- (22) 国際出願日: 2021年9月7日(07.09.2021)
- (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 2020-163105 2020年9月29日(29.09.2020) JP
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 橋本 康弘 (HASHIMOTO Yasuhiro)
[JP/JP]; 〒9601295 福島県福島市光が丘 1
- 番地 福島県立医科大学医学部生化学講座内 Fukushima (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORIタワー3 2階 Tokyo (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, IT, 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,

(54) Title: COMBINED MARKERS FOR DIFFERENTIATING PATHOLOGICAL CONDITIONS OF ALZHEIMER'S DISEASE AND METHOD OF DIFFERENTIATING PATHOLOGICAL CONDITIONS OF ALZHEIMER'S DISEASE USING SAME

(54) 発明の名称: アルツハイマー病病態鑑別用組み合わせマーカ―及びそれを用いたアルツハイマー病病態鑑別方法

[図4]



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of developing biomarkers, by which the occurrence or absence of AD and the onset risk thereof can be specifically and highly sensitively differentiated, and thus providing a kit for detecting the biomarkers and a method of differentiating the pathological conditions of AD using the same. The combined markers according to the present invention enable highly accurate differentiation of the pathological conditions of AD in a subject, namely, the occurrence or absence of AD or MCI and the onset risk thereof.



WO 2022/070798 A1

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))
-

(57) 要約: AD病態の罹患の有無とその発症リスクを特異的に、かつ高感度で鑑別できるバイオマーカーを開発し、そのバイオマーカーを検出するキット、及びそれらを用いたAD病態の鑑別方法を提供することを課題とする。組み合わせマーカーによれば、被験体のAD病態、すなわちAD又はMCIの罹患の有無及び罹患可能性を高精度に鑑別できる。

明 細 書

発明の名称：

アルツハイマー病病態鑑別用組み合わせマーカ―及びそれを用いたアルツハイマー病病態鑑別方法

技術分野

[0001] 本発明は、アルツハイマー病、及びアルツハイマー病に進行し得る認知障害を他の中枢神経疾患と早期に識別するための組み合わせバイオマーカ―、それらを検出するためのキット、及びその組み合わせバイオマーカ―を用いたアルツハイマー病病態鑑別方法に関する。

背景技術

[0002] アルツハイマー病 (Alzheimer's disease：以下、本明細書においてはしばしば「AD」と略称する) は、不可逆的な進行性中枢神経疾患の一種であり、記憶障害や思考障害を伴う認知機能障害 (認知症)、行動障害、又は人格変化等の症状を呈する。認知症の中では最も多い疾患であり、認知症患者全体の約60～80%を占めている。一般には65歳以上の高齢者で発症するが、一部は64歳以下でも発症し、若年性アルツハイマー病と呼ばれている。

[0003] 全世界における認知症の患者数は、2019年時点で5,000万人以上と推定されており、2050年には1億5千万人に達すると予想されている。このうち、約70%がAD患者と考えられている。特に先進諸国では、AD患者の増加に伴う医療費の増大や介護問題等で国や患者関係者達の経済的又は精神的負担が深刻化しており、大きな社会的問題となりつつある。AD患者の脳では、疎水性のペプチドであるアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) の脳内での凝集蓄積に始まり、その後、微小管タンパク質であるtauタンパク質が過リン酸化されて線維化した後に、神経細胞が破壊され、脳が萎縮することにより発症する。家族性 (遺伝性) ADは、これらの代謝に関与するアミロイド前駆体タンパク質 (APP) 遺伝子やプレセニン1 (PSEN1) 遺伝子の変異を原因とするため早期に発症し若年性ADとなる。

[0004] 現在、ADの発症機序に基づき、その発症プロセスを阻害するAD治療薬が多数開発されている。しかし、そのほとんどは臨床治験での十分な有効性が未だに示されていない。これは、治験薬が無効なのではなく、治験対象群が適切でないためとの仮説が提唱されている。従来臨床治験が行われていた対象群は、ADによる脳病変が進行し、大量の神経細胞死が生じた病後期の患者であった。しかし、この段階で治療を開始しても神経機能の回復は望めない。つまり、治療薬の投与時期が遅すぎるために、有効な治療効果を得ることができなかったと考えられている（非特許文献1）。2021年になって、可溶性A β 凝集体に対するモノクローナル抗体が世界で初めてFDAによりAD治療薬として承認された。しかし、この治療薬はアミロイド病理を改善するものの、認知症状の改善には至らなかった（非特許文献2）。このことは、この治療薬の効果はAD病理の進行の抑制に限られる。したがって、適切な投与時期、すなわち、神経細胞死を回避可能な早期段階でAD治療薬を投与することができれば、その有効性が期待し得る。それには、AD病態をより高い精度で鑑別する必要がある。

[0005] 一般に、物忘れ外来を受診した認知症が疑われる患者は、認知症スコア（mini-mental state examination: MMSE）等の検査に基づいて、AD、軽度認知障害（mild cognitive impairment（本明細書においては、しばしば「MCI」と略称する）、及びMCI及びADの診断基準に適合しなかった群（Normal Control：本明細書においては、しばしば「NC」と略称する）の3群に分類される。長期観察研究結果から、NC患者の一部は将来認知症であるMCIへと移行し、MCIの一部は将来より重症なADに移行し得ることが知られている。しかし、認知症スコアのみでは、客観性に乏しい診断法であり、また重症化の移行判断もできなかった。

[0006] AD病態を客観的に、かつ早期に鑑別する方法として、ADの原因因子をAD診断用マーカーとして用いる方法が知られている。そのようなバイオマーカーとして、tauタンパク質、過剰にリン酸化されたtau（p-tau）タンパク質、アミロイド β 42（A β 42）ペプチド、アミロイド β 40（A β 40）ペプチド又は炎

症性疾患におけるサイトカイン（非特許文献3）の他、マンノース非還元末端糖鎖を有するトランスフェリン糖タンパク質（末端Man-Tfタンパク質）（特許文献1）が知られている。

- [0007] しかしながら、tauタンパク質は前頭側頭型認知症や進行性核上麻痺等の認知症でも増加するためAD特異的なバイオマーカーとは言い難かった。一方、p-tauタンパク質は優れたAD診断用マーカーではあるが、このタンパク質の出現は神経細胞の死を意味しており、神経細胞死を回避すべきADの早期診断用としては適切とはいえなかった。同様に、A β 42ペプチドも病気が進行した後でなければ変化しないという問題があった。また、サイトカインは感度よく測定できるものの、疾患特異性に乏しいという欠点があった。さらに、末端Man-Tfは、特異性は高いものの感度の点で十分とは言い難かった。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：W02017/195778

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Selkoe D. J., 2012, Science 337: 1488-92.
非特許文献2：Swanson, et al., 2021, Alz. Res. Ther., doi: 10.1016/j.alzres.2018.06.022
非特許文献3：Li Y. et al., 2015, J. Nucl. Med., 56(2): 270-3.
非特許文献4：Cohen, D.A. and Klunk, E. W., Neurobiol. of Disease, 2014, Vol. 72, Part A: p. 117-122.
非特許文献5：Bloom, G.S., JAMA Neuro, 2014, 71(4): p. 505-8.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、疾患発症前から疾患発症後期にわたるAD病態の罹患の有無とその発症リスクを特異的に、かつ高精度で鑑別できるバイオマーカーを開発し、そのバイオマーカーを検出するキット、及びそれらを用いたAD病態の高精

度な鑑別方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 上記課題を解決するために、本発明者らが鋭意研究を重ね、ヒト大脳におけるin situ hybridization、脳内のTfに結合するマンノース糖鎖の質量分析、及び免疫組織化学的解析により、AD患者の海馬において、共にAD診断用マーカーである末端Man-Tfとp-tauが神経細胞で共局在していることを見出した。この結果は、末端Man-Tfの分泌とtauのリン酸化が相関している可能性を示唆している。そこで、AD患者及びMCI患者から採取した髄液中の末端Man-Tfタンパク質及びp-tauタンパク質又はtauタンパク質の量を組み合わせて感度、特異度との関係を調べた結果、両者の積が、それぞれ単独の場合と比較して優れたAD病態の鑑別マーカーであることを見出した。さらに、N-アセチルグルコサミン非還元末端糖鎖を有するトランスフェリン糖タンパク質（末端GlcNAc-Tfタンパク質）及びプロスタグランジンD2合成酵素（prostaglandin-H2 D-isomerase : PGDS）に関しても他の既知AD診断用マーカーを組み合わせた時に、それぞれ単独の場合と比較してAD病態を鑑別する際の優れたバイオマーカーとなり得ることを見出した。

[0012] 本願発明は、これらの新たな知見に基づき開発されたものであって、以下を提供する。（1）以下の（a）～（c）のいずれかからなるアルツハイマー病病態の鑑別用組み合わせマーカー。

（a）非還元末端にマンノースを有する糖鎖を少なくとも1つ含むトランスフェリン糖タンパク質（Man-Tfタンパク質）又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖のみを含むトランスフェリン糖タンパク質（GlcNAc-Tfタンパク質）又は前記N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を含むその断片、及びプロスタグランジンD2合成酵素（PGDS）又はその断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチド、及びタウタンパク質（tauタンパク質）、リン酸化タウタンパク質（p-tauタンパク質）及びそれらの断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチドの組み合わせ、

(b) 前記Man-Tfタンパク質又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、前記GlcNAc-Tfタンパク質又は前記糖鎖を含むその断片、及び前記PGDS又はその断片からなる群から選択される少なくとも2以上のタンパク質の組み合わせ、又は

(c) 前記Man-Tfタンパク質又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、又はGlcNAc-Tfタンパク質又は前記N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を含むその断片、及びAD indexの組み合わせであって、ここでAD indexは、 $(\text{アミロイド}\beta\text{40ペプチド}/\text{アミロイド}\beta\text{42ペプチド}) \times \text{p-tauタンパク質}$ の式から算出される。

(2) 配列番号1で示すアミノ酸配列からなるトランスフェリン(Tf)タンパク質において、前記Man-Tfタンパク質の非還元末端にマンノースを有する糖鎖は432位のアスパラギン残基に付加されており、前記GlcNAc-Tfタンパク質の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖は432位及び630位のアスパラギン残基に付加されている、(1)に記載の鑑別用組み合わせマーカー。

(3) 前記アルツハイマー病病態がアルツハイマー病(AD)、軽度認知障害(MCI)、及び健常対照(NC)からなる、(1)又は(2)に記載の鑑別用組み合わせマーカー。

(4) 前記NCをMCI移行型健常対照(pre-MCI)及びMCI非移行型健常対照(non-pre-MCI)にさらに鑑別する、(3)に記載の鑑別用組み合わせマーカー。

(5) アルツハイマー病病態の鑑別キットであって、(1)~(4)のいずれかに記載のアルツハイマー病病態の鑑別用組み合わせマーカーのそれぞれに特異的に結合する、ペプチド結合分子及び糖鎖結合分子を含み、前記ペプチド結合分子が特異的に結合するポリペプチドがTfタンパク質、PGDS、及びtauタンパク質からなる群から選択されるいずれか一以上であり、前記糖鎖結合分子が特異的に結合する糖鎖が非還元末端にマンノースを有する糖鎖及び/又は非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖である前記鑑別キット。

(6) 前記ペプチド結合分子が抗体若しくはその活性断片、又はアプタマーである、(5)に記載の鑑別キット。

(7) 前記糖鎖結合分子がレクチン、抗体若しくはその活性断片、及びアプタマーからなる群から選択される、(5)又は(6)に記載の鑑別キット。

(8) アルツハイマー病病態の鑑別方法であって、認知症の疑いのある被験者から得た所定量の体液中に存在する、(1)～(4)のいずれかに記載のアルツハイマー病病態の鑑別用組み合わせマーカーにおけるそれぞれのマーカーの量を、該マーカーのポリペプチドに特異的に結合するペプチド結合分子及び該マーカーの糖鎖に特異的に結合する糖鎖結合分子を用いて測定し、その測定値を得る工程、前記それぞれのマーカーの測定値を乗じて得られる積値を得る工程、及び予め設定されたADカットオフ値及びMCIカットオフ値に基づいて前記積値から前記被験者がAD、MCI、及びNCのいずれに該当し得るかを判定する工程

を含む前記鑑別方法。

(9) MCI移行型健常対照の鑑別方法であって、予め設定されたpre-MCIカットオフ値に基づいて(8)に記載のアルツハイマー病病態の鑑別方法でNCに該当すると判定された被験者の前記積値から前記被験者がpre-MCI及びnon-pre-MCIのいずれに該当し得るかを判定する工程を含む前記鑑別方法。

(10) 以下の(a)～(c)のいずれかからなるアルツハイマー病病態の鑑別用組み合わせマーカー。

(a) 非還元末端にマンノースを有する糖鎖を少なくとも1つ含むトランスフェリン糖タンパク質(Man-Tfタンパク質)又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖のみを含むトランスフェリン糖タンパク質(GlcNAc-Tfタンパク質)又は前記N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を含むその断片、及びプロスタグランジンD2合成酵素(PGDS)又はその断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチド、及びタウタンパク質(tauタンパク質)、リン酸化タウタンパク質(p-tauタンパク質)及びそれらの断片からなる群から選択されるいずれか一

のポリペプチドの組み合わせ、

(b) 前記Man-Tfタンパク質又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、前記GlcNAc-Tfタンパク質又は前記糖鎖を含むその断片、及び前記PGDS又はその断片からなる群から選択される少なくとも2以上のタンパク質の組み合わせ、又は

(c) 前記Man-Tfタンパク質又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、又はGlcNAc-Tfタンパク質又は前記N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を含むその断片、及びAD indexの組み合わせである。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2020-163105号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0013] 本発明の組み合わせマーカーによれば、被験体のAD病態、すなわちAD又はMCIの罹患の有無及び罹患可能性を高精度に鑑別できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] 髄液中に存在するトランスフェリン糖タンパク質の3種のTf糖鎖アイソフォームの構造を示す概念図である。Aはシアル酸非還元末端糖鎖を2本有する末端Sia-Tf糖タンパク質を、BはGlcNAc非還元末端糖鎖を2本有する末端GlcNAc-Tf糖タンパク質を、そしてCはMan非還元末端糖鎖とGlcNAc非還元末端糖鎖をそれぞれ1本ずつ有する末端Man-Tf糖タンパク質を示す。

[図2] 海馬におけるTfタンパク質とリン酸化tau (p-tau) タンパク質の局在を示した免疫組織化学染色図である。Aは健常体の海馬を、BはAD患者の海馬をそれぞれ示す。図中、mergeはTfタンパク質とp-tauタンパク質の染色図を合成した図である。

[図3] 様々な認知症患者における髄液中のMan-Tfタンパク質量を示すドットグラフである。図中、黒三角は、追跡調査によってNCからMCIに移行したNC患者を、また黒四角は追跡調査によってMCIからADに移行したMCI患者を示す。

[図4] 2つのマーカーを組み合わせたときの各AD病態におけるドットグラフである。AはMan-Tfタンパク質のみをマーカーとしたときの比較用ドットグラフ

を、BはMan-Tfタンパク質とp-tauタンパク質の組み合わせマーカを用いたときのドットグラフを、そしてCはMan-Tfタンパク質とtauタンパク質の組み合わせマーカを用いたときのドットグラフを示す。図中の破線は、iNPHを疾患コントロールとした時の各群のカットオフ値を示している。

発明を実施するための形態

[0015] 1. アルツハイマー病病態鑑別用組み合わせマーカ (AD病態鑑別用組み合わせマーカ)

1-1. 概要

本発明の第1の態様は、アルツハイマー病病態鑑別用組み合わせマーカ (本明細書では、しばしば「AD病態鑑別用組み合わせマーカ」又は単に「組み合わせマーカ」と表記する) である。本発明の組み合わせマーカは、2種以上のタンパク質又はそのペプチド断片の組み合わせからなり、認知症の疑いのある被験者に対して後述する第3態様のAD病態鑑別方法において使用することができる。

[0016] 1-2. 定義

本明細書において「アルツハイマー病病態 (Alzheimer's disease state) (本明細書では、しばしば「AD病態」と表記する) とは、リン酸化tauタンパク質の神経細胞内における異常蓄積を発症機序とするタウオパチーにおいて、アルツハイマー病の症状、又はそれに類する軽度な症状を呈する一群をいう。具体的には、アルツハイマー病、及び軽度認知障害 (MCI) 等が該当する。

[0017] 「アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) 」とは、前述のように、認知症、行動障害、又は人格変化等の症状を呈する不可逆的な進行性中枢神経疾患である。

[0018] 「軽度認知障害 (mild cognitive impairment; MCI) 」とは、認知機能 (記憶、決定、理由付け、実行等) のうちの1つに機能障害を生じ、その結果、認知機能の軽微な低下が認められるものの、日常生活には支障がない状態をいう。本明細書においては、MCIを中枢神経疾患に含める。前述のように、MC

I患者の一部は、病状の進行に伴いADに移行することが知られている。

[0019] 本明細書において「正常対照 (normal control; NC)」とは、物忘れ外来を受診した認知症が疑われる患者のうち、認知症スコア等の認知症臨床診断基準によりADでもMCIでもないとして診断されたものをいう。NCと診断された被験者を本明細書では「NC患者」と表記する。

[0020] 本明細書において「認知症が疑われる患者」とは、物忘れ外来を受診した患者全体を指す。認知症が疑われる患者は、AD、MCI、進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy:本明細書では「PSP」と略記する)、前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia; 本明細書では「FTD」と略記する)、レビー小体型認知症 (dementia with Lewy bodies; 本明細書では「DLB」と略記する)、パーキンソン病 (Parkinson's disease: 本明細書では「PD」と略記する) 及びNCのいずれかに該当し、通常、臨床診断基準に従った医師の診断により、いずれかの群に分けられる。この際に用いられる診断基準は、前述の認知症スコア (MMSE) をはじめとして当業者においてよく知られている (例えば、認知症疾患診療ガイドライン2017、医学書院を参照)。

[0021] 本明細書において「軽度認知障害移行型NC (pre-MCI)」とは、NCのうち、治療的介入を伴わなければ、病状の進行によりいずれMCIに移行する可能性が高い病態をいう。従来NCは認知症の臨床診断基準において、いずれの認知症にも該当せず、それ故に認知症に関して正常であると診断されてきた。しかし、今回、本発明のAD病態鑑別用組み合わせマーカーにより、NCであっても、その一部は将来MCIに移行する可能性のある集団が存在し得ることが明らかとなった。そこで、本明細書では、NCをpre-MCIとnon-pre-MCIの2群を包含するものとして考える。

[0022] 「非軽度認知障害移行型NC (non-pre-MCI)」とは、従来のNCとほぼ同義であり、将来的にMCIへの移行の可能性が低く、認知症に関して正常である可能性の高いNCをいう。

[0023] 本明細書において「診断」とは、疾患の罹患鑑別若しくは罹患可能性、又は疾患の病態を判断することをいう。通常、診断行為は、医師、獣医師、又

は歯科医の専権業務であるが、本明細書における診断は、医師等の行為を介することなく、医師等による診断を補助する補助的行為を包含する。

[0024] 本明細書において「罹患（の）鑑別」とは、特定の疾患に罹患しているか、いないかを判断することをいう。病変や病状が類似する他の疾患との識別も含む。

[0025] 本明細書において「罹患（の）可能性」とは、現在の状態から、将来、特定の疾患に移行し、その特定の疾患に罹患する確率をいう。本明細書においては、特定の疾患をADとした場合に、ADに罹患する確率を意味し、特にMCIからADへの移行の確率を意味する。

[0026] 本明細書において「被験体」とは、本発明の各態様における適用対象をいう。具体的には、AD病態の罹患鑑別を目的として本態様の鑑別方法に供される対象をいう。原則として動物個体であるが、その組織や細胞も包含する。具体例として、個体であれば哺乳動物個体、好ましくはヒト、イヌ、ネコ、ウマ等が挙げられる。好ましくはヒトである。個体の場合、生死は問わないが、生体であることが好ましい。個体は、例えば健康診断の受診者のように何らかの疾患に罹患した個体、又は何らかの疾患の罹患可能性のある個体、又は健常体のいずれであってもよい。「疾患の罹患可能性のある個体」とは、例えば、MCIから将来ADへの移行可能性のある個体やNCから将来MCIへの移行可能性のあるpre-MCI個体が該当する。

[0027] 本明細書において「健常体」とは、健常状態にある個体をいう。本明細書において「健常状態」とは、少なくともAD病態等に罹患していない状態、好ましくはあらゆる疾患や障害のない健全な状態を意味する。また、後述の実施例に記載の「疾患対照」は、本明細書では特発性正常圧水頭症（idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus；本明細書では、しばしば「iNPH」と略称する）罹患個体である。iNPHはAD病態とは明白に異なる。それ故に、疾患対照は、本明細書では健常体に該当する。本明細書において健常体は、主に被験体との比較基準である対照体として使用される。したがって、本明細書において被験体と健常体は同一種である。さらに、亜種（人種を含む）、性別

、年齢（月例、週齢を含む）、身長、体重等の条件が同一であることが好ましい。

[0028] 本明細書において、「体液」とは、被験体及び対照体から採取される液状試料をいう。例えば、髄液（脳脊髄液）、血液（血清、血漿及び間質液を含む）、尿、リンパ液、消化液、腹水、胸水、神経根周囲液、各組織若しくは細胞の抽出液等が挙げられる。好ましくは髄液又は血液、より好ましくは髄液である。

[0029] 本明細書において、「髄液（cerebrospinal fluid：CSF）とは、脳と脊髄の中樞神経系（CNS：Central Nerve System）周囲にのみ存在する無色透明の細胞外液をいう。他の臓器とは硬膜によって、また血液とは血液脳関門や血液脳脊髄液関門によって、隔てられている。髄液は、その大部分が脳の実質より滲出することや、脳細胞と髄液の間には障壁が事実上存在しないことが近年の研究から明らかとなっている（Wang C, et al., 2012, Cerebrospinal Fluid: Physiology, biomarker and methodology. In: V. S, Dolezal, T., editor. Cerebrospinal Fluid: Functions, Composition and Disorders. New York: Nova Science Publishers; pp.1-37.）。この髄液中には、中枢神経系由来のタンパク質が多数存在し、中枢神経系疾患に伴い、その発現が増減することが知られている。例えば、AD病態においては、髄液の量が増加し、 $A\beta$ を含む脳の老廃物の排除がなされること等が示唆されている（Lliff, et al., Sci. Transl. Med., 2010, 4）。

[0030] 本明細書において「糖タンパク質」とは、一以上の糖鎖が付加したタンパク質をいう。糖タンパク質において糖鎖は、翻訳後修飾の一つとして付加され、生体内のタンパク質の50%以上に存在するとされている。糖鎖は、タンパク質の安定化、保護、生理活性、抗原抗体反応、ウイルス感染及び体内動態等に関与する等、様々な機能をタンパク質に付与する重要な役割を担う。

[0031] 本明細書において「（その糖鎖を含む）ペプチド断片」とは、前記糖タンパク質の一部からなり、かつ目的の糖鎖が付加されたアミノ酸残基を含むペプチドである。例えば、末端Man-Tfの一部からなり、かつマンノース非還元

末端糖鎖が付加した432位のアスパラギン残基を含むペプチド等が挙げられる。ペプチド断片のアミノ酸数は特に限定はしない。糖タンパク質の一部であることから下限はエピトープを包含し得る長さ、例えば、8アミノ酸以上、好ましくは10又は15アミノ酸以上、より好ましくは20又は30アミノ酸以上であればよく、上限は糖タンパク質の全長未満のアミノ酸を有していればよい。

[0032] 本明細書において「マーカー」とは、疾患の罹患又は罹患可能性を鑑別するための指標分子をいう。本明細書では、マーカーは、生体由来の分子、特にポリペプチド（糖タンパク質及びその断片を含む）を対象とするバイオマーカーが該当する。マーカーは、被験体の生体組織から検出されるが、本明細書においては、好ましくは体液から検出される。

[0033] 本明細書において「組み合わせマーカー」とは、複数の前記マーカーを組み合わせることで、所定の目的を達成し得るマーカーをいう。ここで言う「所定の目的」とは、アルツハイマー病態の鑑別をいう。

[0034] 本明細書において、「有意」とは、統計学的に有意であることをいう。統計学的に有意とは、被験対象の測定値と対照値の差異を統計学的に処理したときに、両者間に有意差があることをいう。本発明であれば、被験体と健常体群の末端Man-Tf量の測定値の差異を統計学的に処理したときの両者間の有意差が該当する。例えば、得られた値の危険率（有意水準）が小さい場合、具体的には5%より小さい場合（ $p < 0.05$ ）、1%より小さい場合（ $p < 0.01$ ）、0.1%より小さい場合（ $p < 0.001$ ）が挙げられる。ここに示す「p（値）」は、統計学的検定において、帰無仮説に基づいた分布の中で、検定統計量が偶然その値になる確率を示す。したがって「p」が小さいほど、検定統計量がその値となる確率は低く、帰無仮説が棄却されやすいことを意味する。統計学的処理の検定方法は、優位性の有無を判断可能な公知の検定方法を適宜使用すればよく、特に限定しない。例えば、スチューデントt検定法、共変量分散分析等を用いることができる。

[0035] 1 - 3. 構成

本発明の「アルツハイマー病病態鑑別用組み合わせマーカー（AD病態鑑別

用組み合わせマーカ―)」は、2種以上のタンパク質又はペプチド断片からなるマーカ―の組み合わせで構成され、認知症の疑いのある被験者に対してAD病態におけるAD又はMCIの罹患可能性を鑑別可能なバイオマーカ―である。

[0036] 1-3-1. 組み合わせマーカ―を構成するマーカ―

本発明の組み合わせマーカ―は2以上のマーカ―で構成される。本発明の組み合わせマーカ―は、トランスフェリン糖タンパク質又は所定の糖鎖を含むその断片、プロスタグランジンD2合成酵素又はその断片、tau関連タンパク質又はその断片、及びAD indexである。以下、それぞれのマーカ―について説明をする。

[0037] (1) トランスフェリン糖タンパク質 (Tf糖タンパク質)

本明細書において「トランスフェリン糖タンパク質」(本明細書では、しばしば「Tf糖タンパク質」と表記する)とは、トランスフェリンタンパク質において、N結合型糖鎖が付加されたタンパク質である。

[0038] トランスフェリン (Transferrin; Tf) タンパク質 (本明細書では、しばしば「Tfタンパク質」と表記する)は、2個の鉄 (Fe) イオンと可逆的に結合し、その生体内輸送を担う分子量約80KDaのキャリアタンパク質である。Tfタンパク質の具体例として、698個のアミノ酸残基で構成され、配列番号1で示すアミノ酸配列からなるヒトTfタンパク質が挙げられる。

[0039] Tf糖タンパク質にはタンパク質部分が共通で、付加されるN結合型糖鎖の構造のみが異なる3種のアイソフォームが存在する。具体的には、末端Man-Tfタンパク質、末端GlcNAc-Tfタンパク質、そして末端Sia-Tfタンパク質である。このうち、本発明の組み合わせマーカ―を構成し得るTf糖タンパク質は、末端Man-Tfタンパク質と末端GlcNAc-Tfタンパク質である。それぞれのTf糖タンパク質について、以下で具体的に説明をする。

[0040] (i) 末端Man-Tfタンパク質

「末端Man-Tfタンパク質」とは、非還元末端にマンノース (本明細書では、しばしば「Man」と表記する)を有するN結合型糖鎖、すなわちMan非還元末端糖鎖を少なくとも1つ含むTf糖タンパク質であって、本発明の組み合わせマ

ーカーの構成マーカである。例えば、図1のCに示すように、2本の糖鎖のうち一方にMan非還元末端糖鎖が、また他方にGlcNAc非還元末端糖鎖が付加された構造を有するTf糖タンパク質が挙げられる。より具体的には、ヒト末端Man-Tfタンパク質であれば、配列番号1で示すアミノ酸配列において、432位のアスパラギン(Asn:N)残基(「N432」で表記する)の側鎖にMan非還元末端糖鎖が付加され、同じく630位のアスパラギン残基(「N630」で表記する)の側鎖にGlcNAc非還元末端糖鎖が付加されたTf糖タンパク質が該当する。

- [0041] 末端Man-Tfタンパク質は、脳の大部分を先天性に欠損する無脳症では、髄液中で検出されないことから、脳内で生合成されると考えられている。
- [0042] 末端Man-Tf量は、AD病態で増加する。すなわち、体液中、主として髄液中の末端Man-Tf量が健常体と比較して増加し、それ故に、末端Man-Tfは、単独でもAD病態を反映するAD病態鑑別用マーカーとなり得る。一方、iNPH患者では、健常体と比較して体液中、主として髄液中の末端Man-Tf量に有意差が認められないことから、iNPHの鑑別用マーカーとはなり得ない。また、初期ADの症状と、DLB又はFTDの初期症状は、症候学的差異からの鑑別は容易ではないがDLBやFTDでも、健常体と比較して体液中、主として髄液中の末端Man-Tf量に有意差が認められない。したがって、体液中の末端Man-Tf量を測定することでADと、DLB又はFTDを容易に鑑別することができる。
- [0043] なお、Man非還元末端糖鎖を含む末端Man-Tfタンパク質のペプチド断片も本発明の組み合わせマーカースの構成マーカーとなり得る。

[0044] (ii) 末端GlcNAc-Tfタンパク質

「末端GlcNAc-Tfタンパク質」とは、非還元末端にN-アセチルグルコサミン(本明細書では、しばしば「GlcNAc」と表記する)を有するN結合型糖鎖、すなわちGlcNAc非還元末端糖鎖のみを含むTf糖タンパク質であって、本発明の組み合わせマーカースの構成マーカーである。例えば、図1のBに示すように、2本のGlcNAc非還元末端糖鎖が付加されたTf糖タンパク質が挙げられる。より具体的には、ヒト末端GlcNAc-Tfタンパク質であれば、配列番号1で示すアミノ酸配列において、432位のアスパラギン(Asn:N)残基(「N432」で表記す

る)と630位のアスパラギン残基(「N630」で表記する)の側鎖にGlcNAc非還元末端糖鎖が付加されたTf糖タンパク質が該当する。末端GlcNAc-Tfタンパク質は、脳及び/又は脊髄のような中枢神経系の細胞で産生され、主として髄液中に見られる脳型糖タンパク質と考えられている。これらの脳型糖タンパク質は、髄液の産生量を反映するバイオマーカーとしても知られている(Murakami, et al., Proc. Jpn. Acad., Ser.B, 2019, 95, 198-210.)。

[0045] 一般に末端GlcNAc-Tfタンパク質は、iNPH鑑別用マーカーであることが知られている(特開2010-121980号)。iNPH患者では、健常体と比較して体液中、主として髄液中の末端GlcNAc-Tfタンパク質量が有意に減少している。一方、AD患者やMCI患者では健常体と比較して体液中、主として髄液中の末端GlcNAc-Tfタンパク質量に有意差は認められない。したがって、末端GlcNAc-Tfタンパク質単独では、AD病態の鑑別用マーカーとはなり得ない。

[0046] なお、GlcNAc非還元末端糖鎖を含む末端GlcNAc-Tfタンパク質のペプチド断片も本発明の組み合わせマーカーの構成マーカーとなり得る。

[0047] (iii) 末端Sia-Tfタンパク質

「末端Sia-Tfタンパク質」とは、非還元末端に α 2,6シアル酸を有するN結句型糖鎖、すなわちSia非還元末端糖鎖のみを含むTf糖タンパク質である。Tf糖タンパク質の1アイソフォームであるが、本発明の組み合わせマーカーの構成マーカーではない。例えば、図1のAに示すように、2本のSia非還元末端糖鎖が付加されたTf糖タンパク質が挙げられる。末端Sia-Tfは、血清及び髄液のいずれにも存在しているが、特に血清中に多量に存在することから、「血清Tf(糖タンパク質)」とも言われる。末端Sia-Tfは、他の糖タンパク質との糖鎖構造の類似性から肝臓で生合成されるTf糖タンパク質と考えられている。

[0048] 末端GlcNAc-Tfタンパク質も末端Man-Tfタンパク質と同様に、無脳症では髄液中で検出されないことから、脳内で生合成されると考えられている。

[0049] (2) プロスタグランジンD2合成酵素(PGDS)

「プロスタグランジンD2合成酵素(本明細書では、しばしば「PGDS」と表

記する)は、プロスタグランジンエンドペルオキシドからプロスタグランジンD₂ (PGD₂) への反応を触媒する酵素であって、本発明の組み合わせマーカの構成マーカである。PGDSタンパク質の具体例として、190個のアミノ酸残基で構成され、配列番号2で示すアミノ酸配列からなるヒトPGDSタンパク質が挙げられる。PGDSは、髄液中の含有量が比較的多いことが知られているが、その1%程度の濃度が血中からも検出され得る。PGDSはまた、髄液の産生量を反映するバイオマーカとしても知られている (Murakami, et al., Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 2019, 95, 198-210.)。

[0050] (3) tau関連タンパク質

本明細書において「tau関連タンパク質」とは、tauタンパク質、及びリン酸化tauタンパク質 (本明細書では、しばしば「p-tauタンパク質」と表記する) をいう。tauタンパク質は、軸索輸送に関与する微小管結合タンパク質であり、中枢神経系及び末梢神経系の神経細胞内やグリア細胞内に存在する。ADではtauタンパク質が過剰にリン酸化され、p-tauタンパク質となる。このp-tauタンパク質が、微小管の安定を阻害し、細胞内凝集塊を作ることで神経細胞死を引き起こすと考えられている。tauタンパク質及びp-tauタンパク質はいずれも細胞内タンパク質であるため、通常、体液中でのこれらの検出は神経細胞死を意味する。tau関連タンパク質は、ADやMCIの他、PSPやFTD等の認知症マーカとなり得ることが知られており、臨床においてもADマーカとして使用されている。

[0051] 本発明の組み合わせマーカの構成マーカであるtauタンパク質の具体例として、441個のアミノ酸残基で構成され、配列番号3で示すアミノ酸配列からなるヒトtauタンパク質が挙げられる。なお、ヒトtauタンパク質には、前記配列番号3で示すアミノ酸配列の他、そのスプライスバリエントである352~412個のアミノ酸残基からなる6種類のアイソフォームが存在する。これらのアイソフォームも本発明の組み合わせマーカの構成マーカとなり得る。p-tauタンパク質においてリン酸化が起こる位置は多様であり、通常、ADでは、過剰なリン酸化が起きるため、複数のアミノ酸残基においてリン酸化が起

き得る。具体的には、例えば、配列番号3で示すアミノ酸配列における位置で表すと、181位のスレオニン残基、199位のセリン残基、202位のセリン残基、205位のスレオニン残基又は231位のスレオニン残基等を含むアミノ酸残基におけるリン酸化が挙げられる。p-tauの検出は、例えば、リン酸化部位特異的な検出、部位非特異的なリン酸化の検出、又はその組み合わせによって行うことができる。

[0052] (4) AD index

「AD index」は、通常、 $(A\beta 40/A\beta 42) \times p\text{-tau}$ で算出される値であり、ADにおけるA β ペプチド及びp-tauタンパク質の代謝変化の両者を反映するマーカーである。また、AD indexの算出には、例えば、 $(A\beta 42/A\beta 40) \times p\text{-tau}$ が使用される場合もあるが、本明細書においてはいずれの式で算出された値も包含する。AD indexは、現在、臨床で用いられているADマーカーでは、単独で最もAD診断能が高いとされている。

[0053] 1-3-2. 構成マーカーの組み合わせ

本発明のAD病態鑑別用組み合わせマーカーにおける構成マーカーの組み合わせとして以下が挙げられる。

[0054] (1) Man-Tf/GlcNAc-Tf/PGDSとtau/p-tauの組み合わせ

第1の組み合わせパターンとして、Man-Tfタンパク質又はManを有する糖鎖を含むその断片、GlcNAc-Tfタンパク質又はGlcNAcを有する糖鎖を含むその断片、及びPGDS又はその断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチドからなる構成マーカーと、tauタンパク質、p-tauタンパク質及びそれらの断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチドからなる構成マーカーとの組み合わせが挙げられる。

[0055] ここで「Manを有する糖鎖を含むその断片」とは、Man-Tfタンパク質において、Man非還元末端糖鎖が付加されたアスパラギン残基を含むペプチド断片を言う。例えば、Man非還元末端糖鎖が付加されたN432及び/又はN630を含むMan-Tfタンパク質断片が該当する。

[0056] また「GlcNAcを有する糖鎖を含むその断片」とは、GlcNAc-Tfタンパク質に

において、Man非還元末端糖鎖が付加されたアスパラギン残基を含むペプチド断片を言う。例えば、Man非還元末端糖鎖が付加されたN432とN630を含むMan-Tfタンパク質断片が該当する。

[0057] より具体的な構成マーカーの組み合わせは、Man-Tfタンパク質又はManを有する糖鎖を含むその断片とtauタンパク質又はその断片、Man-Tfタンパク質又はManを有する糖鎖を含むその断片とp-tauタンパク質又はそのリン酸化部位を含む断片、GlcNAc-Tfタンパク質又はGlcNAcを有する糖鎖を含むその断片とtauタンパク質又はその断片、GlcNAc-Tfタンパク質又はGlcNAcを有する糖鎖を含むその断片とp-tauタンパク質又はそのリン酸化部位を含む断片、及びPGDSタンパク質又はその断片とtauタンパク質又はその断片、PGDSタンパク質又はその断片とp-tauタンパク質又はそのリン酸化部位を含む断片である。

[0058] (2) Man-Tf/GlcNAc-Tf/PGDSにおける2以上の組み合わせ

第2の組み合わせパターンとして、Man-Tfタンパク質又はManを有する糖鎖を含むその断片、GlcNAc-Tfタンパク質又はGlcNAcを有する糖鎖を含むその断片、及びPGDS又はその断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチドからなる構成マーカーから選択される少なくとも2以上のタンパク質の組み合わせが挙げられる。

[0059] より具体的な構成マーカーの組み合わせは、Man-Tfタンパク質又はManを有する糖鎖を含むその断片及びGlcNAc-Tfタンパク質又はGlcNAcを有する糖鎖を含むその断片の2つの構成マーカーの組み合わせ、Man-Tfタンパク質又はManを有する糖鎖を含むその断片及びPGDS又はその断片の2つの構成マーカーの組み合わせ、GlcNAc-Tfタンパク質又はGlcNAcを有する糖鎖を含むその断片及びPGDS又はその断片の2つの構成マーカーの組み合わせ、及びMan-Tfタンパク質又はManを有する糖鎖を含むその断片、GlcNAc-Tfタンパク質又はGlcNAcを有する糖鎖を含むその断片及びPGDS又はその断片の3つの構成マーカーの組み合わせである。

[0060] 上記いずれの組み合わせマーカーもAD病態としてAD、MCIをNCと鑑別することができる。また、NCにおけるpre-MCIとnon-pre-MCIとを鑑別することもで

きる。

[0061] (3) Man-Tf/GlcNAc-TfとAD indexの組み合わせ

第3の組み合わせパターンとして、Man-Tfタンパク質又はManを有する糖鎖を含むその断片、及びGlcNAc-Tfタンパク質又はGlcNAcを有する糖鎖を含むその断片と、AD indexとの組み合わせが挙げられる。

[0062] 2. アルツハイマー病病態鑑別キット (AD病態鑑別キット)

2-1. 概要

本発明の第2の態様は、アルツハイマー病病態鑑別キットである。本発明のキットは、試料中に含まれ得る第1態様に記載のAD病態鑑別用マーカの検出が可能であり、それによって被験体のAD病態の罹患又は罹患の可能性の鑑別ができる。

[0063] 2-2. 構成

本発明のAD診断キットは、第1態様に記載のAD病態鑑別用組み合わせマーカのそれぞれに特異的に結合するペプチド結合分子及び糖鎖結合分子を必須の構成物として含む。以下、それぞれについて具体的に説明をする。

[0064] (1) ペプチド結合分子

本明細書において「ペプチド結合分子」とは、AD病態鑑別用組み合わせマーカの構成マーカにおけるポリペプチド又はそのペプチド断片に特異的に結合する分子をいう。ここでいう構成マーカのポリペプチド、すなわち標的ポリペプチドとして、Tfタンパク質、PGDS、及びtauタンパク質が挙げられる。

[0065] 本発明のAD診断キットは、これらのポリペプチドに結合するペプチド結合分子を一以上含む。ペプチド結合分子は、ペプチド、核酸、低分子化合物、又はそれらの組み合わせのいずれであってもよい。

[0066] (i) ペプチドで構成されるペプチド結合分子

ペプチドで構成されるペプチド結合分子には、抗体又はその活性断片が挙げられる。

抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体又は組換え抗体のいずれ

れであってもよい。より特異的な検出を可能にするためには、モノクローナル抗体又は組換え抗体が好ましい。抗体のグロブリンタイプは、特に限定されるものではなく、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD、IgYのいずれであってもよいが、IgG及びIgMが好ましい。また、本態様の抗体の由来生物種は、特に限定はしない。哺乳動物及び鳥を含めたあらゆる動物由来とすることができる。例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジ、ラクダ、ウマ、ニワトリ、又はヒトなどが挙げられる。

[0067] 本明細書において前記「組換え抗体」とは、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体及び合成抗体をいう。

[0068] 「キメラ抗体」とは、ある抗体において、軽鎖及び重鎖の定常領域（C領域：Constant region）を他の抗体の軽鎖及び重鎖のC領域で置換した抗体である。例えば、マウス抗ヒトモノクローナル抗体において、その軽鎖及び重鎖のC領域を適当なヒト抗体のC領域と置換した抗体が該当する。つまり、この場合、CDRを包含する可変領域（V領域：Variable region）はマウス抗体由来であり、C領域はヒト抗体由来となる。

[0069] 「ヒト化抗体」とは、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、標的抗原に対するヒト以外の哺乳動物由来の抗体中のCDRとヒト抗体のCDRとを置換したモザイク抗体である。例えば、マウス抗ヒトMan-Tf抗体の各CDR領域（CDR1～CDR3）をコードするDNA配列を、適当なヒト抗体由来の対応する各CDRをコードするDNA配列と置換した組換え抗体遺伝子を調製し、それを発現させることによって得られる抗体が該当する。

[0070] 「合成抗体」とは、化学的方法又は組換えDNA法を用いることによって合成した抗体をいう。例えば、適当な長さで配列を有するリンカーペプチド等を介して、特定の抗体の一以上のVL及び一以上のVHを人工的に連結させた一量体ポリペプチド分子、又はその多量体ポリペプチドが該当する。このようなポリペプチドの具体例としては、一本鎖Fv（scFv：single chain Fragment of variable region）（Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995, Pierce Chemical Co., Rockford, IL参照）、ダイアボディ（diabody）、トリアボディ

ィ (triabody) 又はテトラボディ (tetrabody) 等が挙げられる。免疫グロブリン分子において、VL及びVHは、通常別々のポリペプチド鎖（軽鎖と重鎖）上に位置する。一本鎖Fvは、これら2つのポリペプチド鎖上のV領域を十分な長さの柔軟性リンカーによって連結し、1本のポリペプチド鎖に包含した構造を有する合成抗体断片である。一本鎖Fv内において両V領域は、互いに自己集合して1つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。一本鎖Fvは、それをコードする組換えDNAを、公知技術を用いてファージゲノムに組み込み、発現させることで得ることができる。ダイアボディは、一本鎖Fvの二量体構造を基礎とした構造を有する分子である (Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。トリアボディ、及びテトラボディは、ダイアボディと同様に一本鎖Fv構造を基本としたその三量体、及び四量体構造を有する。それぞれ、三価、及び四価の抗体断片であり、多重特異性抗体であってもよい。

[0071] 抗体は、標的ポリペプチドとの解離定数が、 10^{-8}M 以下、好ましくは 10^{-9}M 以下、より好ましくは 10^{-10}M 以下の高い親和性を有することが好ましい。上記解離定数は、当該分野で公知の技術を用いて測定することができる。例えば、BIAcoreシステム (GE Healthcare社) により速度評価キットソフトウェアを用いて測定してもよい。

[0072] 本工程で使用する本態様のポリクローナル抗体は、抗原となるポリペプチド、すなわちTfタンパク質、PGDS、及びtauタンパク質、又はそれらのペプチド断片を適当な動物に免疫した後、免疫動物から当該分野で公知の方法により回収することができる。また、モノクローナル抗体も当該分野の慣用技術である公知の方法により得ることができる。例えば、前記抗原でマウスを免疫した後、免疫マウスから抗体産生細胞を採取する。その抗体産生細胞を骨髓腫（ミエローマ）細胞株に融合させ、それによりハイブリドーマ細胞を生成し、そして標的ポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定すればよい。

[0073] 「抗体フラグメント」とは、前述の抗体の抗原結合活性を有するペプチド

断片であって、例えば、Fab、F(ab')₂、Fv等が挙げられる。

[0074] 本工程で使用する抗体又はその抗体フラグメントは、修飾されていてもよい。ここでいう「修飾」とは、抗体検出に必要な標識、又は抗原特異的結合活性化に必要な機能上の修飾を含む。標識には、例えば、前述の蛍光物質、蛍光タンパク質（例えば、PE、APC、GFP）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、又はビオチン若しくは（ストレプト）アビジンによる標識が挙げられる。また、修飾には、標的ポリペプチドに対する親和性を調整するため行われる抗体のグリコシル化等が挙げられる。具体的には、例えば、抗体のフレームワーク領域（FR：Framework region）において、グリコシル化部位を構成するアミノ酸残基に、置換を導入してグリコシル化部位を除去し、それによって、その部位のグリコシル化を喪失させる改変等がある。

[0075] 「その活性断片」とは、抗原結合性や免疫応答活性を保持している抗体の部分断片をいう。

[0076] 本発明のAD診断キットにおける具体的な抗体として、例えば、抗Tf抗体、抗PGDS抗体、抗tau抗体、抗p-tau抗体、抗A β 40抗体、及び抗A β 42抗体が挙げられる。

[0077] (ii) 核酸で構成されるペプチド結合分子

核酸で構成されるペプチド結合分子には、例えば、核酸アプタマーが挙げられる。

「核酸アプタマー」とは、核酸で構成されるアプタマーであって、水素結合等を介した一本鎖核酸分子の二次構造、及び三次構造に基づいて形成される立体構造によって標的物質と強固、かつ特異的に結合する能力を持つリガンド分子をいう。

[0078] 本明細書で使用する核酸アプタマーは、当該分野で公知の方法により作製することができる。例えば、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法を用いた試験管内選別法が挙げられる。SELEX法とは、例えば、RNAアプタマーを分離する場合であれば、「ランダム配列領域

とその両端にプライマー結合領域を有する多数のRNA分子によって構成されるRNAプールから標的分子に結合したRNA分子を選択する。回収したRNA分子をRT-PCR反応によって増幅した後、得られたcDNA分子を鋳型として転写を行い、選択されたRNA分子の増幅産物を得て、それを次のラウンドのRNAプールにする」という一連のサイクルを数～数十ラウンド繰り返して、標的分子に対して、より結合力の強いRNA分子を選択する方法である。一方、SELEX法で、DNAアプタマーを分離する場合も基本手順は同じであるが、回収したDNA分子を増幅する際にRT-PCR反応を経る必要がない。ランダム配列領域とプライマー結合領域の塩基配列長は特に限定はしない。一般的にランダム配列領域は、20～80塩基、プライマー結合領域は、それぞれ15～40塩基の範囲が好ましい。標的分子への特異性を高めるためには、予め標的分子に類似する分子とRNAプール又はDNAプールとを混合し、標的分子に類似する分子と結合しなかったRNA分子又はDNA分子からなるプールを用いればよい。なお、SELEX法は、公知の方法であり、具体的な方法は、例えば、Panら (Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, U.S.A. 92 : 11509-11513) に準じて行えばよい。本発明では、標的分子を糖鎖マンノースとして、上記の方法を実行することにより最終的に得られた核酸分子をマンノースに対する核酸アプタマーとして利用することができる。

[0079] 核酸アプタマーは、一般に、RNAアプタマーとDNAアプタマーが知られているが、本明細書における核酸アプタマーを構成する核酸は特に限定はしない。例えば、DNAアプタマー、RNAアプタマー、DNAとRNAの組み合わせで構成されるアプタマー等を含む。一般的にはRNAアプタマーが頻用されるが、安定性、化学合成における製造コスト、及びアプタマー製造における工程数の点ではDNAアプタマーが優れている。

[0080] 本工程で使用する核酸アプタマーは、標的分子への結合能を阻害しない範囲において、蛍光物質（例えば、FITC、Texas、Cy3、Cy5、Cy7、Cyanine3、Cyanine5、Cyanine7、FAM、HEX、VIC、フルオレサミン及びその誘導体、及びローダミン及びその誘導体等）、放射性同位元素（例えば、³²P、³³P、³⁵S）

、又はビオチン若しくは（ストレプト）アビジン等の標識物質により標識することもできる。

[0081] 本発明のAD診断キットにおける具体的な核酸アプタマーとして、例えば、Tfタンパク質結合RNAアプタマー、PGD結合RNAアプタマー、tauタンパク質結合RNAアプタマー、及びp-tauタンパク質結合RNAアプタマーが挙げられる。

[0082] なお、本発明のAD診断キットにおけるペプチド結合分子は、必要に応じて担体に固定化されているか、あるいは蛍光色素又は発光物質等で標識化されていてもよい。

[0083] (2) 糖鎖結合分子

本明細書において「糖鎖結合分子」とは、AD病態鑑別用組み合わせマーカーの構成マーカーにおける糖タンパク質の糖鎖に特異的に結合する分子をいう。ここでいう構成マーカーのポリペプチド、すなわち標的糖タンパク質として、Tf糖タンパク質であるMan-Tfタンパク質及びGlcNAc-Tfタンパク質が挙げられる。本発明のAD診断キットは、これらのTf糖タンパク質の糖鎖に結合する糖鎖結合分子を一以上含む。糖鎖結合分子は、ペプチド、核酸、低分子化合物、又はそれらの組み合わせのいずれであってもよい。

[0084] (i) ペプチドで構成される糖鎖結合分子

ペプチドで構成される糖鎖結合分子には、レクチン、又は抗体又はその活性断片が挙げられる。

[0085] (レクチン)

「レクチン」とは、免疫反応以外で、糖鎖に結合するタンパク質又は糖タンパク質をいう。本発明のアルツハイマー病病態鑑別キットに含まれ得るレクチンには、Man又はGlcNAcを含む糖鎖、好ましくは末端Man又は末端GlcNAcを含む糖鎖、より好ましくはMan非還元末端糖鎖又はGlcNAc非還元末端糖鎖に結合するレクチンが挙げられる。

[0086] 糖鎖の非還元末端部がManの場合、Man非還元末端糖鎖結合性レクチンが挙げられる。Man非還元末端糖鎖結合性レクチンの具体例として、例えば、UDAレクチン又はBC2L-Aレクチンをはじめとした<http://jcggdb.jp/rcmg/glycodb>

/LectinSearchに記載の45種のMan結合レクチン等が挙げられる。また、堀らは藻類から得られた非還元末端Man結合性のレクチンを多数分離しており、これらの利用も考えられる(バイオサイエンスとインダストリー, 71, 129-133, 2013)。

[0087] 糖鎖の非還元末端部がGlcNAcの場合、GlcNA非還元末端糖鎖結合性レクチンが挙げられる。GlcNA非還元末端糖鎖結合性レクチンの具体例として、例えば、マメ科Griffonia simplicifolia由来の凝集素GSL-IIレクチン及びツクリタケ (*Agaricus bisporus*) 由来の凝集素ABAレクチン、ムジナタケ(*Psathyrella velutina*)子実体由来の凝集素PVLレクチンが知られている。

[0088] ところで、レクチンには、標的分子が糖タンパク質の場合と、糖鎖のみの場合とでは、見かけ上の糖鎖結合特異性に差異を生じる場合がある。例えば、イラクサ (*Urtica dioica*) 由来のUDAレクチンは、標的分子が糖鎖の場合にはGlcNAc結合レクチンに分類されるが、標的分子が糖タンパク質の場合、末端GlcNAc-Tfタンパク質には結合せず、末端Man-Tfタンパク質のMan非還元型末端に特異的に結合するようになる。したがって、レクチンの結合は糖鎖のみでなく標的分子である末端Man-Tfタンパク質又は末端GlcNAc-Tfタンパク質を用いて検討することが好ましい。つまり、本発明のキットを構成するレクチンは、末端Man-Tfタンパク質のMan又は末端GlcNAc-Tfタンパク質のGlcNAc、好ましくは末端Man-Tfタンパク質の末端Man又は末端GlcNAc-Tfタンパク質の末端GlcNAc、より好ましくは末端Man-Tfタンパク質の非還元末端Man又は末端GlcNAc-Tfタンパク質の非還元末端GlcNAcに結合するレクチンである。レクチンは、市販のレクチンを利用してもよい。例えば、ビオチン化UDAレクチン (Cat No BA-8005-1 ; EY社) や、細菌由来のBC2L-Aレクチン (*Burkholderia cenocepacia lectin-A* ; 和光純薬工業) を利用することができる。

[0089] (抗体又はその活性断片)

抗体又はその活性断片の構成については、前述の「(1) ペプチド結合分子, (i) ペプチドで構成されるペプチド結合分子」で具体的に記載しており、本発明でもそれに準じることから、ここではその説明を省略する。糖鎖に

結合する抗体の具体的な例としては、Manを含む糖鎖、好ましくは末端Manを含む糖鎖、より好ましくは非還元型末端Manを含む糖鎖を認識して結合する抗体、及びGlcNAcを含む糖鎖、好ましくは末端GlcNAcを含む糖鎖、より好ましくは非還元型末端GlcNAcを含む糖鎖を認識して結合する抗体が挙げられる。

[0090] (ii) 核酸で構成される糖鎖結合分子

核酸で構成される糖鎖結合分子には、例えば、核酸アプタマーが挙げられる。

核酸アプタマーの構成やその作製方法については、前記「(1) ペプチド結合分子、(ii) 核酸で構成されるペプチド結合分子」で具体的に記載しており、本発明でもそれに準じることから、ここではその説明を省略する。

なお、本発明のAD診断キットにおける核酸結合分子は、必要に応じて担体に固定化されているか、あるいは蛍光色素又は発光物質等で標識化されていてもよい。

[0091] 昨今開発が進んでいるAD治療薬（特にA β に対するモノクローナル抗体）の多くは認知の低下を抑制するものである。したがって、これら治療薬は、発症初期段階の患者に投与して、症状の進行を早期に抑制することにより最も効果を発揮し得る。このことから、認知症が顕在化するpre-MCI患者に投与することが最も望ましい。しかしながら、確立されたMCI発症前の予測鑑別マーカーは、従来存在しなかった。本発明の組み合わせマーカーは、優れたAD病態鑑別マーカーであるのみならず、pre-MCI患者の鑑別をも可能にするものであり、今後のAD早期診断及び治療へ貢献できるものと期待される。

[0092] 3. アルツハイマー病病態の鑑別方法（AD病態鑑別方法）

3-1. 概要

本発明の第3の態様は、AD病態鑑別方法である。本発明のAD罹患鑑別方法は、認知症の疑いのある被験者由来の体液中に存在する第1態様のAD病態鑑別用組み合わせマーカーの量を測定し、その測定値に基づいて被験者がAD、MCI、及びNCのいずれに該当し得るかを判定することができる。

[0093] 3-2. 方法

本発明のAD病態鑑別方法は、測定工程、積値算出工程、及び判定工程を必須の工程として含む。以下、各工程について具体的に説明をする。

[0094] (1) 測定工程

「測定工程」は、認知症の疑いのある被験者から得た所定量の体液中に存在する第1態様に記載のAD病態鑑別用組み合わせマーカールにおけるそれぞれのマーカールの量を測定し、その測定値を得る工程である。

[0095] 体液は、好ましくは髄液又は血液である。髄液及び血液の採取方法は、既知の方法であればよく、特に限定はしない。例えば、髄液であれば腰椎穿刺により採取すればよい。腰椎穿刺は、事前に市販の局所麻酔薬を用いることで、痛みを採血以下にすることが可能であり、また無外傷性針を用いることで、副作用を軽減できることから侵襲性が比較的 low、髄液を採取する場合には好適な方法である。血液であれば、公知の採血方法に従って採取すればよい。なお、被験体と対照体の体液は、一方が髄液であれば他方も髄液とするように、原則として互いに同種の体液とする。

[0096] 「所定量」は、容量又は重量により予め定められた量をいう。所定量は特に限定はしなが、少なくとも被験者の体液中、好ましくは髄液中に含まれる第1態様に記載のAD病態鑑別用マーカールが測定可能な量である必要がある。例えば、髄液が $5\mu\text{L}\sim 1\text{mL}$ 、又は髄液タンパク質量として、 $5\mu\text{g}\sim 200\mu\text{g}$ あればよい。

[0097] 本明細書において「測定値」とは、本工程で測定されるAD病態鑑別用組み合わせマーカールにおけるそれぞれのマーカールの量を示す値である。測定値は、容量又は重量のような絶対値であってもよく、また濃度、イオン強度、吸光度又は蛍光強度のような相対値であってもよい。

[0098] 前記マーカールの量は、AD病態鑑別用組み合わせマーカールのそれぞれの構成マーカールのポリペプチドに特異的に結合するペプチド結合分子、及び該構成マーカールの糖鎖に特異的に結合する糖鎖結合分子を用いて測定すればよい。ペプチド結合分子、及び糖鎖結合分子の構成については、第2態様で詳述していることから、ここでは具体的な説明を省略する。

- [0099] 測定方法は、ペプチド結合分子及び糖鎖結合分子を用いて測定する公知のタンパク質又は糖タンパク質の定量方法であればよく、特に限定はしない。例えば、抗体を用いた免疫学的検出法、レクチンを用いたレクチン検出法、質量分析法又はそれらの組み合わせ法が挙げられる。
- [0100] 免疫学的検出法には、例えば、酵素免疫測定法（ELISA法、EIA法を含む）、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法（RIA）、発光免疫測定法、表面プラズモン共鳴法（SPR法）、水晶振動子マイクロバランス（QCM）法、免疫比濁法、ラテックス凝集免疫測定法、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応、粒子凝集反応法、金コロイド法、キャピラリー電気泳動法、ウェスタンブロット法又は免疫組織化学法（免疫染色法）が挙げられる。
- [0101] レクチン検出法には、レクチンブロッティング法が挙げられる。
- 質量分析法には、高速液体クロマトグラフ質量分析法（LC-MS）、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法（LC-MS/MS）、ガスクロマトグラフ質量分析法（GC-MS）、ガスクロマトグラフタンデム質量分析法（GC-MS/MS）、キャピラリー電気泳動質量分析法（CE-MS）及びICP質量分析法（ICP-MS）が挙げられる。
- [0102] 組み合わせ法には、例えば、レクチンと抗体を用いたサンドイッチELISA法及びそれと同様の原理を用いた自動化法、好ましくは、ハイスルーットレクチン阻害 - 自動ラテックス凝集法を利用することができる。AD病態鑑別用組み合わせマーカーの構成マーカーが糖タンパク質の場合、糖鎖とタンパク質のそれぞれを標的として検出する組み合わせ法が糖タンパク質を高い精度で定量することができるため好ましい。組み合わせ法の具体例として、末端Man-Tfタンパク質をAD病態鑑別用組み合わせマーカーにおける構成マーカーの一つとして測定する場合、抗Tf抗体を吸着させたプレート等の担体に体液（例えば、髄液）を通して末端Man-Tfタンパク質を吸着させ、その後、Man結合分子であるUDAレクチンをプローブとして末端Man-Tfタンパク質を検出する方法が挙げられる。また、逆にUDAレクチンを吸着させたプレート等の担体に体液（例えば、髄液）を通して末端Man-Tfタンパク質を吸着させ、その後、抗T

f抗体で末端Man-Tfタンパク質を検出する方法もある。

[0103] 上記分析法は、いずれも当該分野に公知の技術であって、それらの方法に準じて行えばよい。例えば、Green, M.R. and Sambrook, J., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Fourth Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Christopher J., et al., 2005, Chemical Review, 105:1103-1169; Iijima Y. et al., 2008, The Plant Journal, 54, 949-962; Hirai M. et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101 (27) 10205-10210; Sato S, et al., 2004, The Plant Journal, 40(1)151-163; Shimizu M. et al., 2005, Proteomics, 5, 3919-3931に記載の方法に準じて行うことができる。また、各メーカーからタンパク質定量キットが市販されており、それらを利用することもできる。

[0104] (2) 積値算出工程

「積値算出工程」は、前記測定工程で得られたそれぞれのマーカーの測定値を乗じて得られる積値を得る工程である。

[0105] (3) 判定工程

「判定工程」は、予め設定されたADカットオフ値及びMCIカットオフ値に基づいて前記積値から前記被験者がAD、MCI、及びNCのいずれに該当し得るかを判定する工程である。

[0106] 本明細書において「カットオフ値」とは、その値を基準として疾患の罹患リスクの有無又は病態の判定をし得る値を指す。好ましくは、カットオフ値によって、感度及び特異度の両方が十分に高い値を示す。一般に、比較する対照群と疾患群との直接の比較に基づいて描かれたROC曲線から公知の方法を用いて導かれるが、これに限定しない。比較する対照群と疾患群との直接の比較でなくてもよく、ROC曲線を用いずにカットオフ値を設定してもよい。

[0107] 「ROC曲線(Receiver Operating Characteristic curve、受信者動作特性曲線)」とは、縦軸を真の陽性率 (TPF: True Position Fraction)、すなわち感度、横軸を偽陽性率 (FPF: False Position Fraction)、すなわち(1-特異度)とし、検査結果のどの値を所見ありと判断するかの閾値、つまりカッ

トオフポイント (cutoff point) を媒介変数として変化させてプロットしていくことで作成される。ここで特異度とは、陰性者を正確に陰性と判断する率である。

- [0108] 「ADカットオフ値」とは、積値算出工程で得られた積値に基づいて、本発明の鑑別方法の対象となった被験者のADに罹患可能性の有無を判定する基準となるカットオフ値をいう。積値がADカットオフ値よりも高い場合、その被験者はADの罹患可能性が高いと判定する。積値がADカットオフ値よりも低い場合、その被験者はADの罹患可能性は低く、MCI又はNCのいずれかである可能性が高いと判定する。
- [0109] ADカットオフ値の具体的な値は、AD鑑別用組み合わせマーカールにおける構成マーカールの組み合わせによって異なる。各組み合わせにおけるADカットオフ値は、表1～4に示している。例えば、AD鑑別用組み合わせマーカールがMan-Tfタンパク質とp-tauタンパク質の組み合わせの場合、表1からADカットオフ値は、97.8となる。
- [0110] 「MCIカットオフ値」とは、積値算出工程で得られた積値に基づいて、本発明の鑑別方法の対象となった被験者のMCIに罹患可能性の有無を判定する基準となるカットオフ値をいう。積値がMCIカットオフ値よりも高い場合、その被験者はMCIの罹患可能性が高いと判定する。積値がADカットオフ値よりも低い場合、その被験者はNCである可能性が高いと判定する。
- [0111] MCIカットオフ値の具体的な値は、AD病態鑑別用組み合わせマーカールにおける構成マーカールの組み合わせによって異なる。各組み合わせにおけるMCIカットオフ値は、表1～4に示している。例えば、AD病態鑑別用組み合わせマーカールがMan-Tfタンパク質とp-tauタンパク質の組み合わせの場合、表1からMCIカットオフ値は、110となる。
- [0112] 本態様のAD病態鑑別方法は、公知のAD病態鑑別方法の代わりに又はそれと組み合わせて実施することができる。公知のAD病態鑑別方法としては、例えば、認知症スコアの測定、 ^{11}C ピッツバーグ組成物 (Pittsburgh compound : PiB) を使用したアミロイドPET (positron emission tomography : 陽電子放出断

層撮影)及びフルオロ-2-デオキシ-D-グルコース (FDG)を使用したPET等が挙げられる。

[0113] 4. MCI移行型健常対照の鑑別方法 (pre-MCI鑑別方法)

4-1. 概要

本発明の第4の態様は、MCI移行型健常対照の鑑別方法 (pre-MCI鑑別方法)である。本発明のpre-MCI鑑別方法は、被験者がNCであった場合に、pre-MCI及びnon-pre-MCIのいずれに該当し得るかを判定することができる。

[0114] 4-2. 方法

本発明のpre-MCI鑑別方法は、測定工程、積値算出工程、判定工程、及び再判定工程を含む。このうち測定工程、積値算出工程、及び判定工程は、前記第3態様のAD病態鑑別方法と同一である。すなわち、本発明のpre-MCI鑑別方法は、前記第3態様のAD病態鑑別方法に引き続き行われる鑑別方法である。以下、本発明の特徴である再判定工程について説明をする。

[0115] (4) 再判定工程

「再判定工程」は、予め設定されたpre-MCIカットオフ値に基づいて、前記第3態様のAD病態鑑別方法における前記判定工程でNCに該当すると判定された被験者の積値算出工程で得られた積値から前記被験者がpre-MCI及びnon-pre-MCIのいずれに該当し得るかを判定する工程である。

[0116] 「pre-MCIカットオフ値」とは、被験者が第3態様のAD病態鑑別方法でNCと判定された場合に、MCI移行可能性の高いNCか、そうでないNCかを判定する基準となるカットオフ値をいう。

[0117] 第3態様のAD病態鑑別方法における判定工程で、AD又はMCIと判定された被験者は、本発明のpre-MCI鑑別方法の対象外であり、NCと判定された被験者のみが対象となる。積値算出工程で得られた積値がpre-MCIカットオフ値よりも高い場合、その被験者はpre-MCIであり、現在はNCだが将来的にMCIに移行する可能性が高いと判定する。一方、積値がpre-MCIカットオフ値よりも低い場合、その被験者はMCIに移行する可能性が低いnon-pre-MCI、つまり真のNCであると判定する。

本態様のpre-MCI鑑別方法は、公知のAD病態鑑別方法等と併用することができる。

実施例

[0118] <実施例 1 : 海馬におけるTfタンパク質とp-tauタンパク質の局在>

(目的)

ADマーカーとして知られるMan-Tfタンパク質の海馬における局在性を検証する。

(方法)

短期記憶を司る海馬は、最も早期に神経細胞死、組織の萎縮が進行する部位であるため、AD患者、対照用の健常体の海馬を抗Tfタンパク質抗体及び抗p-tau抗体で二重染色を行った。ホルマリン固定された海馬から5ミクロンの切片を作製し、スライドグラス上で免疫染色した。一次抗体には、抗Tfタンパク質抗体 (A0061, Dako Ltd.) 及び抗p-tauタンパク質抗体 (AT8, コスモバイオ株式会社) を、二次抗体にはAlexa Fluor 488又は594ラベル化抗体 (The rmo Fisher Scientific) を用いた。なお、Man-Tfタンパク質は、大脳皮質のTfタンパク質における糖鎖アイソフォームの85%以上を占めることが質量分析の結果から明らかとなっている。

[0119] (結果)

図2に結果を示す。Tfタンパク質は、健常体 (図2A) 及びAD患者 (図2B) のいずれでも検出されたが、健常体に比べてAD患者でやや強く検出された。一方、p-tauタンパク質は、健常体では検出されなかったが、AD患者では検出された。

興味深いことに、Tfタンパク質陽性細胞のいくつかは、矢印で示すようにp-tauタンパク質陽性細胞でもあった (図2B)。これらの結果から、Tfタンパク質分泌はAD病態の進行と共に増加し、Tfタンパク質とp-tauタンパク質が共局在することが示唆された。

[0120] 細胞がストレスにさらされ、ミスホールドタンパク質が増加すると高マンノース糖鎖がタグとなりタンパク質の高次構造の再校正が起こることが知ら

れている (Helenius A. and Aebi M., Ann. Rev. Biochem., 2004, 73:1019-1049)。このことから、Man-Tfタンパク質の増加はストレス応答に起因している可能性がある。

[0121] <実施例 2 : 髄液中Man-Tfタンパク質の測定>

(目的)

髄液中Man-Tfタンパク質の量を測定し、様々な認知症に対するMan-Tfタンパク質のマーカーとしての効果を検証した。

[0122] (方法)

1. 各疾患の診断

認知症外来を受診した患者316名に対して、既存の診断方法により診断すると共に、試料として各患者から腰椎穿刺により5 mLの髄液を採取した。

1-1. AD病態及びその他の神経変性疾患の診断

外来ADの罹患疑いのある患者を下記AD診断基準に従い、MCI及びADに分類し、いずれにも属さなかった患者群をNCとした。同時に、神経変性を伴う認知症であるtauタンパク質が蓄積するAD以外のタウオパチー及び α シヌクレインが蓄積するシヌクレイノパチーについても下記診断基準により、分類した。以下の実施例において、タウオパチー及びシヌクレオパチーについては、しばしば「その他の神経変性疾患」と称する。

また、特発性正常圧水頭症 (iNPH) は、ADと同様に認知症と脳室拡大を示すが、神経変性を示さないので、疾患対照とした。

[0123] (1) ADの診断

National Institute on Aging-Alzheimer's association workgroup (NIA-AA) による臨床診断基準に従った。

(2) MCIの診断

NIA-AA診断ガイドライン作成ワークグループから推奨されたADを背景にしたMCIの臨床診断基準に従った。

(3) タウオパチーの診断

タウオパチーの具体的疾患として進行性核上麻痺 (PSP) 及び前頭側頭型認

知症 (FTD) が挙げられる。これらの診断については、認知症疾患診療ガイドライン2017 (医学書院 電子版ISBN 978-4-260-62858-7) に従った。

(4) シヌクレイノパチーの診断

シヌクレイノパチーの具体的疾患としてレビー小体型認知症 (DLB) 及びパーキンソン病 (PD) が挙げられる。DLBについては、認知症疾患診療ガイドライン2017 (前掲) に従った。また、PDについては、パーキンソン病診療ガイドライン2018 (医学書院) に従った。

(5) 疾患対照の診断

iNPHの診断は、特発性正常圧水頭症診療ガイドライン第3版 (メディカルレビュー社) に従った。

[0124] 2. 髄液中のMan-Tfタンパク質の測定

Man-Tfタンパク質の測定では、rBC2L-Aレクチンを糖鎖結合分子として用いた。捕捉反応は、プレート上に抗ヒトTf抗体を固相化して行った。具体的には、抗ヒトTf抗体 (A0061, Dako Ltd) を100mMカーボネートバッファー (pH 9.5) で1 μ g/mLに希釈し、100 μ Lをマイクロタイタープレートに加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。TBSで1回洗浄後、ブロッキング剤として10% N101 (富士フィルム和光純薬) を含むTBSを加えて室温で1時間インキュベートし、抗体固相化プレートを作製した。

[0125] 試料の髄液(5~10 μ L)は、終濃度で0.6%の2-メルカプトエタノール及び0.03%のSDSを含むPBST (phosphate-buffered saline/0.05% Tween-20) 中で55 $^{\circ}$ Cで60分間の前処理を行なった。ブロッキングした前記抗体固相化プレートをTBSTで1回洗浄した後、前処理した試料を10mM CaCl₂を含むTBST (TBST-CaCl₂) で希釈して加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。TBST-CaCl₂で3回洗浄後、ビオチン化rBC2L-A (50 ng/mL) を含むTBST-CaCl₂を100 μ L加え、室温で2時間インキュベートした。rBC2L-Aは、予めEz-Link NHS-biotin (#21336, Pierce) を使用して、添付のプロトコルに従ってビオチン化した。TBST-CaCl₂を加えて2回洗浄し、HRP標識ストレプトアビジン (50ng/mL) を含むTBST-CaCl₂を100 μ L加えた後、室温で2時間インキュベートした。TBST-CaCl₂にて2回洗浄後

、TMB Micro well Peroxidase substrate system (#50-76-11, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) 試薬を100 μ L加え、発色反応を行った。1Mリン酸100 μ Lにて反応を停止し、450nmで吸光度をVarioskan LUX multimode microplate reader (Thermo Fischer Scientific) を用いて測定した。この際、定量用の標準として、糖鎖末端にシアル酸 α 2,6ガラクトース β 1,4GlcNAc β 1, (3/6) -マンノース残基を有するヒト血清Tf (cat No. T1147, Sigma-Aldrich) をシアリダーゼ、ガラクトシダーゼ、及びヘキソサミニダーゼで逐次消化を行うことで作製した、糖鎖末端にマンノース残基を持つTf糖鎖異性体を使用した。

統計解析はSPSS (version 26) によって行なった。One factor ANOVA解析後、Turkey-Kramer comparisonにより多重比較を行なった。

[0126] (結果)

図3に結果を示す。多重検定の結果、疾患対照であるiNPH ($2.12 \pm 0.71 \mu\text{g}/\text{mL}$) に対してNC ($3.56 \pm 1.46 \mu\text{g}/\text{mL}$)、MCI ($3.72 \pm 1.54 \mu\text{g}/\text{mL}$) 及びAD ($2.99 \pm 1.01 \mu\text{g}/\text{mL}$) ではMan-Tfタンパク質が有意に増加していた。一方、その他の神経変性疾患 (PSP+FTD及びDLB+PD) では増加は認められなかった。

また、追跡調査によって、NC群の23症例のうち5症例がMCIに移行し (図中、黒三角)、MCI群の42症例のうち2症例がADへ移行した (図中、黒四角)。

以上の結果により、Man-Tfタンパク質の測定値は、AD病態において特異的に上昇し、特にNCやMCIで、その上昇幅が大きいことが示唆された。さらに、黒四角の分布からADに移行し得るMCI患者はMan-Tfタンパク質の測定値から予測し得ることが示唆された。一方、黒三角の分布からも明らかなようにMan-Tfタンパク質単独の測定値ではMCIに移行し得るNC患者 (pre-MCI患者) の予測は困難であることが示唆された。

[0127] <実施例3：ADマーカーの組み合わせによる鑑別精度の向上>

(目的)

二種類のADマーカーを組み合わせることでAD病態の鑑別精度を向上することができるかについて検証する。

[0128] (方法)

実施例1の結果からp-tauタンパク質とTfタンパク質は同一神経細胞内に共局在することが示唆された。そこで、これら二種類のADマーカーを組み合わせ、それぞれの量を測定した。また、ADの発症では、まずAD発症の20年以上前にアミロイド斑(A β タンパク質の沈着)が生じ、続いてその約10年後にp-tauタンパク質の沈着が発生することが想定されている。そこで、A β ペプチドとp-tauタンパク質より算出されるAD indexとTfタンパク質の組み合わせについても検証した。tauタンパク質、p-tauタンパク質、A β 40ペプチド、及びA β 42ペプチドの測定には以下のELISA kitを用いた。

・ tauタンパク質 (181位のスレオニン残基におけるリン酸化を含む) の測定:

FinoScholar・hTAU 10-992 フィノスカラー・pTAU (ニプロ)

メーカーの推奨により400 pg/mL以上を陽性とした。

・ p-tauタンパク質の測定:

FinoScholar・hTAU 10-994 フィノスカラー・pTAU (ニプロ)

メーカーの推奨により50 pg/mL以下を陰性とした。

・ A β 40ペプチドの測定:

Human/rat β amyloid (40) ELISA Kit, Wako II (cat No. 294-64701, 富士フイルム和光純薬)

・ A β 42ペプチドの測定:

Human/rat β amyloid (42) ELISA Kit, Wako, High Sensitive (cat No. 292-64501, 富士フイルム和光純薬)

AD indexは、測定したp-tauタンパク質量、A β 40ペプチド量、及びA β 40ペプチド量に基づいて、 $(A\beta 40/A\beta 42) \times p\text{-tau}$ により算出した。

[0129] それぞれのマーカーの測定値を乗じて得られる積値に基づき、組み合わせマーカーのカットオフ値を得た。AD及びMCIのそれぞれのカットオフ値は、ROC曲線からYoden法を用いて設定した。一方、NCにおけるpre-MCIのカットオフ値については、「ADが疑われる患者 (NC+MC+AD)」と「疾患コントロール

(iNPH) 」の比較に基づいて求めたカットオフ値を疑似的に用いた。感度及び特異度は、カットオフ値から算出し、信頼度を表すAUC (area under the curve) は、受信者動作特定 (ROC) 曲線を用いて算出した。

[0130] (結果)

表1、表2、及び図4に結果を示す(感度及び特異度は70%以上を、AUCは0.75以上を太字で示した。)

[0131] [表1]

		p-tau				tau			
iNPH vs	cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度	
NC	49.5	0.937	67.1	96.2	398	0.800	22.2	96.2	
MCI	51	0.928	59.4	96.2	406	0.884	44.4	96.2	
AD	50	0.975	87.5	96.2	403	0.970	84.8	96.2	

		Man-Tf				p-tau x Man-Tf				tau x Man-Tf			
iNPH vs	cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度	
NC	2.62	0.805	72.2	82.7	99.4	0.931	86.6	88.5	559	0.918	91.9	80.4	
MCI	2.67	0.846	81.0	82.7	110	0.919	83.9	90.4	559	0.907	88.9	88.5	
AD	2.62	0.776	67.2	82.7	97.8	0.957	93.9	88.5	615	0.962	100	90.4	

1 AUC : area under the curve、ROC 曲線の信頼度を表す。

2 NC の"cutoff"は、iNPH vs (NC + MCI + AD)のデータを用いた。このデータに基づいて感度・特異度・AUCを求めた。

[0132]

[表2]

					AD index			
iNPH vs	cutoff	AUC	感度	特異度				
NC	370	0.784	81.4	62.1				
MCI	399	0.830	88.9	65.5				
AD	607	0.941	100	89.7				
					AD index xMan-Tf			
Man-Tf								
iNPH vs	cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度
NC	2.62	0.805	72.2	82.7	1090	0.878	79.1	86.2
MCI	2.67	0.846	81.0	82.7	1260	0.897	77.8	89.7
AD	2.62	0.776	67.2	82.7	1160	0.946	100	86.2
					AD index xGlcNAc-Tf			
GlcNAc-Tf								
iNPH vs	cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度
NC	6.31	0.698	57.8	82.7	2580	0.833	74.4	86.2
MCI	6.31	0.758	71.4	82.7	2580	0.874	83.3	86.2
AD	5.17	0.634	76.5	48.1	2470	0.921	100	82.8

[0133] (1) 組み合わせマーカによるMCI及びADの鑑別精度

図4 A及び表1に示すように、Man-Tfタンパク質のみをマーカーとした場合には、MCI群では、2.67 μg/mLのMCIカットオフ値により感度81.0%、特異度82.7%となった。また、ROC曲線の信頼度を評価するAUCは0.846であった。同様に、AD群では、2.62 μg/mLのADカットオフ値により特異度82.7%となったが感度67.2%であった。また、AUCでは、MCIでは0.776であった。この結果から、Man-Tfタンパク質のみをマーカーとした場合AD病態の鑑別精度は十分ではないことが示唆された。

[0134] p-tauタンパク質のみ、又はtauタンパク質のみをマーカーとした場合も、表1に示すように、AD群では感度（p-tau：87.5%、tau：84.8%）及び特異度（p-tau：96.2%、tau：96.2%）共に高く、AUCも0.9を超えていたが、MCI群では、特異度（p-tau：96.2%、tau：96.2%）は高いものの、感度がかなり低い値であった（p-tau：59.4%、tau：44.4%）。したがって、p-tauタンパク質又はtauタンパク質も、単独では鑑別精度が十分でないことが示唆された。

[0135] そこで、Man-Tfタンパク質及びp-tauタンパク質の組み合わせで、感度、特

異度、及びAUCを算出した。図4Bで示すように、MCI群は、Man-Tfタンパク質及びp-tauタンパク質の測定値の積値（p-tau×Man-Tf）に基づくMCIカットオフ値（110a.u.：破線）で検証した結果、表1に示すように、感度が83.9%、特異度は90.4%といずれも高く、AUCも0.919を示した。一般に、AUCが0.9を超える場合、極めて高い鑑別精度と見なされる。また、AD群でも前記積値に基づくADカットオフ値（98a.u.：破線）で検証した結果、感度93.9%、特異度が88.5%と共に高く、AUCも0.957と極めて高い値を示した。したがって、Man-Tfタンパク質及びp-tauタンパク質の組み合わせはMCI及びADの鑑別に対して極めて高い精度が得られることが示された。

[0136] 同様に、Man-Tfタンパク質及びtauタンパク質の組み合わせで、感度、特異度、及びAUCを算出した。図4Cで示すように、MCI群は、MCIカットオフ値（559 a.u.：破線）で検証した結果、表1に示すように、感度88.9%、特異度88.5%とどちらも高く、AUCは0.907であった。また、AD群では、ADカットオフ値（615 a.u.：破線）で検証した結果、表1に示すように、感度100%、特異度90.4%といずれも非常に高く、AUCも0.962と極めて高い値を示した。従って、Man-Tfタンパク質及びtauタンパク質の組み合わせもMCI及びADの鑑別に対して極めて高い精度が得られることが示された。

[0137] (2) 組み合わせマーカのNC群への適用

実施例2に記載したように、追跡調査によりNC群の一部はMCIに移行することが明らかになっている。しかし、Man-Tfタンパク質単独の測定値ではMCIに移行し得るNC患者（pre-MCI患者）と移行しないNC患者（non-pre-MCI）の予測鑑別は困難であった。そこで、組み合わせマーカにおける各マーカ測定値に積値に基づいて設定したカットオフ値をNC群に適用した。

[0138] p-tau×Man-Tf、又はtau×Man-Tfの組み合わせマーカを用いたときのそれぞれの積値に基づきpre-MCIカットオフ値（それぞれ99.4、559）で検証した結果、表1に示すように、いずれの組み合わせでも感度（それぞれ86.6、及び91.9）及び特異度（それぞれ88.5、及び80.4）が80%を上回り、AUC（それぞれ0.931、及び0.918）も0.9を超える等、MCI発症前における優れた予測

鑑別マーカーとなり得ることが示された。また、Man-Tfタンパク質又はGlcNAc-Tfタンパク質と、AD indexとの積値においても、同様にMCI及びADの鑑別に対して高い精度が得られ、MCI発症前における優れた予測鑑別マーカーとなり得ることが示された。

[0139] 一方、その他の神経変性疾患群（PSP+FTD+DLB+PD）に対して、このカットオフ値を適用した場合、カットオフ値以上の割合が、p-tau×Man-Tfの場合は28%、tau×Man-Tfの場合は37%と、いずれも非常に低く、これらの積の値の増加はAD病態特異的であることが示された。

[0140] 以上から、Man-Tfタンパク質、p-tauタンパク質及びtauタンパク質の組み合わせマーカーは、AD病態及びpre-MCIの鑑別において、感度、及び特異度において極めて優れたマーカーとなることが示された。

[0141] <実施例4：他の組み合わせマーカーによるAD鑑別精度の検証>

（目的）

実施例3以外の組み合わせマーカーによるAD病態の鑑別精度について検証する。

[0142] （方法）

実施例3の髄液試料の一部を用いて、GlcNAc-Tfタンパク質とPGDSの量を以下の方法で測定した。

GlcNAc-Tfタンパク質の測定は、基本的にMan-Tfタンパク質の検出方法に準じた。まず、rPVL (recombinant *Psathyrella velutina* lectin, Medical and Biological Laboratories Co., Ltd.) を固定化したプレートを作製し、rPVL (1 µg/0.1 mL) をプレートに加え、4°Cで一晩インキュベートした。次にブロッキング剤として10%ブロッカー（KAC Co., Ltd.）を含む50mM TBS加えて4°Cで4時間ブロッキングを行った。

[0143] 次に、ブロッキングしたビオチン固相化プレートをTBSTで1回洗浄後、前処理した試料を加え、4°Cで一晩インキュベートした。TBSTで2回洗浄後、抗Tf抗体 (A0061, Dako Ltd.) 溶液 (0.5 µg/mL) を100 µL加え、室温で2時間インキュベートした。TBSTで2回洗浄後、2万倍希釈した西洋ワサビペルオキシ

ダーゼ標識抗ウサギIgG抗体 (Promega, W4011) 溶液 (0.1 μg/mL) を100 μL 加え、室温で2時間インキュベートした。TBSTで2回洗浄後、2倍希釈のTMB Micro well Peroxidase substrate system (#50-76-11, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., MD) 試薬を100 μL加えて発色反応を行った。1Mリン酸 100 μLを加えて反応を停止し、450 nmで吸光度をVarioskan LUX multimode microplate reader (Thermo Fischer Scientific, K.K., Tokyo) にて測定した。このとき、定量用の標準として、糖鎖末端にシアル酸 α2,6ガラクトース β1,4GlcNAc β1, (3/6) -マンノース残基を持つヒト血清Tf (cat No. T1147, Sigma-Aldrich) をシアリダーゼ及びガラクトシダーゼで逐次消化を行うことで作製した、糖鎖末端に β1,4GlcNAc β1, (3/6) -マンノース残基を持つTf 糖鎖異性体を使用した。

[0144] PGDSの量を測定には、市販のELISAキット (Human prostaglandin D synthase (Lipocalin-type) ELISA (Cat. No.: RD191113100R, BioVendor)) を用いた。

カットオフ値の設定や感度、特異度、及びAUCの算出は実施例4に準じた。

[0145] (結果)

結果を表3及び4に示す。

[0146] [表3]

		p-tau				tau							
iNPH vs		cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度				
	NC	49.5	0.937	67.1	96.2	398	0.800	22.2	96.2				
	MCI	51	0.928	59.4	96.2	406	0.884	44.4	96.2				
	AD	50	0.975	87.5	96.2	403	0.970	84.8	96.2				
		GlcNAc-Tf				p-tau x GlcNAc-T				tau x GlcNAc-Tf			
iNPH vs		cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度
	NC	6.31	0.698	57.8	82.7	205	0.913	90.2	80.8	1420	0.893	82.6	88.5
	MCI	6.31	0.758	71.4	82.7	208	0.903	87.1	80.8	1420	0.887	83.3	88.5
	AD	5.17	0.634	76.5	48.1	249	0.948	87.9	90.4	1940	0.936	84.4	94.2
		PGDS				p-tau x PGDS				tau x PGDS			
iNPH vs		cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度
	NC	11.1	0.671	48.6	82.7	340	0.910	88.2	82.7	2260	0.887	82.7	86.5
	MCI	7.36	0.570	94.1	30.8	340	0.884	80.8	82.7	2260	0.865	75.0	86.5
	AD	10.1	0.761	76.5	73.1	440	0.962	93.9	88.5	2270	0.953	96.9	86.5

[0147] [表4]

INPH vs	Man-Tf x GlcNAc-Tf				Man-Tf x PGDS				Man-Tf x GlcNAc-Tf x PGDS			
	cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度
NC	13.7	0.788	77.6	73.1	29.5	0.792	64.5	86.5	150	0.776	76.6	74.5
MCI	18.2	0.822	76.2	88.5	21.3	0.792	85.3	61.5	151	0.800	76.5	75.0
AD	13.3	0.752	76.5	71.2	27.4	0.809	74.5	78.8	150	0.773	76.5	75.0

[0148] 髄液でGlcNAc-Tfタンパク質及びPGDS濃度を測定し、iNPH群との比較を行った。表3に示すように、GlcNAc-Tfタンパク質単独の場合は、NC、MCI及びAD群で有意に増加したが、感度及び特異度は高くはなかった。PGDS単独の場合は、AD群のみ有意な増加が見られたが、感度、特異度は高くなく、AUCも80%を下回り、良好なマーカーとは言い難かった。

[0149] 一方、GlcNAc-Tfタンパク質とp-tauタンパク質又はtauタンパク質との積値、及びPGDSとp-tauタンパク質又はtauタンパク質との積値に基づくカットオフ値の場合は、表3で示すように、実施例3と同様に、いずれのAD病態に関しても感度、及び特異度が高い値を示し、AUCも0.8を大きく上回る鑑別精度が得られた。よって、本発明の組み合わせマーカーによればAD病態を高い精度で鑑別できることが示された。

[0150] また、実施例3と同様に、その他の神経変性疾患群（PSP+FTD+DLB+PD）に対して、本実施形態の組み合わせマーカーの積値に基づくカットオフ値を適用した場合、カットオフ値以上の割合がいずれも26%~37%と低く、これらの積値の上昇がAD病態特異的であることが改めて示された。

[0151] さらに、髄液以外の試料における組み合わせマーカーの有用性を調べるためにiNPHの個体とMCIの個体において、本実施例と同じ方法により血清中のPGDS濃度を測定した。従来知られていた通り、PGDS単独ではiNPHとMCIの間でその量に明確な差異は見られなかった。そこで、同一個体の上記解析で用いたp-tauの測定値と血清中のPGDS濃度の積値を算出し、疑似的な組み合わせマーカーとした。すると、この積値を用いた場合、マーカーの値がiNPHに比べてMCIで高く、両者の間に有意傾向が見られた。このことから、髄液以外の試料からの測定結果を用いた場合においても、組み合わせマーカーが有用である

ことが示唆された。

[0152] <実施例5：異なるAD indexによるAD鑑別精度の検証>

(目的)

($A\beta 42/A\beta 40$) \times p-tauの式をAD indexに用いた場合における、組み合わせマーカのAD病態の鑑別精度について検証する。

(方法)

AD indexの算出以外は実施例3と同様に行った。

AD indexとして、本実施例においては($A\beta 42/A\beta 40$) \times p-tauの式によって算出された値を用いた。

[0153] (結果)

結果を表5に示す(感度及び特異度は70%以上を、AUCは0.75以上を太字で示した。)

[0154] [表5]

		(Ab42/40) x p-tau							
iNPH vs		cutoff	AUC	感度	特異度				
	NC	3.32	0.847	94.4	79.3				
	MCI	3.02	0.826	83.3	79.3				
	AD	2.35	0.813	100	65.5				
		Man-Tf			{(Ab42/40) x p-tau} x Man-Tf				
iNPH vs		cutoff	AUC	感度	特異度	cutoff	AUC	感度	特異度
	NC	2.62	0.805	72.2	82.7	8.48	0.941	94.4	82.8
	MCI	2.67	0.846	81.0	82.7	7.21	0.895	88.9	79.3
	AD	2.62	0.776	67.2	82.7	5.56	0.872	100	72.4

[0155] 上記AD indexのみをマーカとした場合には、MCI群では、感度が83.3%、特異度が79.3%といずれも高く、AUCは0.826であった。しかし、AD群においては、感度は100%と高かったものの、特異度が65.5%と低い値であった。したがって、上記AD indexも、単独では鑑別精度が十分でないことが示唆された。

[0156] そこで、Man-Tfタンパク質と上記AD indexの組み合わせで感度、特異度、及びAUCを算出した。Man-Tfタンパク質及び上記AD indexの測定値の積値をマーカとして用いた場合、それぞれ単独では十分な鑑別ができなかったAD群

において、感度が100%、特異度が72.4%と鑑別精度が改善し、AUCも0.872を示した。さらに、もともと鑑別精度が高かったMCI群においても、感度が88.9%、AUCが0.895とさらに高い値を示した。

[0157] Man-Tfタンパク質及び上記AD indexの測定値の積値をNC群へ適用した場合も、同様にそれぞれ単独の場合と比較して優れた鑑別精度を示し、MCI発症前における優れた予測鑑別マーカーとなり得ることが示された。

また、上記AD indexを使用した場合も、AD indexとして $(A\beta 40/A\beta 42) \times p\text{-tau}$ を使用した場合と同様の結果が得られたことから、本発明の組み合わせマーカーは、AD indexの計算式にかかわらず、MCI及びADの精度の高い鑑別マーカーであり、MCI発症前における優れた予測鑑別マーカーともなり得ることが示された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 以下の（a）～（c）のいずれかからなるアルツハイマー病病態の鑑別用組み合わせマーカ－。

（a）非還元末端にマンノースを有する糖鎖を少なくとも1つ含むトランスフェリン糖タンパク質（Man-Tfタンパク質）又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖のみを含むトランスフェリン糖タンパク質（GlcNAc-Tfタンパク質）又は前記N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を含むその断片、及びプロスタグランジンD2合成酵素（PGDS）又はその断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチド、及びタウタンパク質（tauタンパク質）、リン酸化タウタンパク質（p-tauタンパク質）及びそれらの断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチドの組み合わせ、

（b）前記Man-Tfタンパク質又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、前記GlcNAc-Tfタンパク質又は前記糖鎖を含むその断片、及び前記PGDS又はその断片からなる群から選択される少なくとも2以上のタンパク質の組み合わせ、又は

（c）前記Man-Tfタンパク質又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、又は前記GlcNAc-Tfタンパク質又は前記N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を含むその断片、及びAD indexの組み合わせである。

[請求項2] AD index は、（アミロイドβ40ペプチド／アミロイドβ42ペプチド）×p-tauタンパク質の式から算出される、請求項1に記載の鑑別用組み合わせマーカ－。

[請求項3] 配列番号1で示すアミノ酸配列からなるトランスフェリン（Tf）タンパク質において、前記Man-Tfタンパク質の非還元末端にマンノースを有する糖鎖は432位のアスパラギン残基に付加されており、前記GlcNAc-Tfタンパク質の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖

鎖は432位及び630位のアスパラギン残基に付加されている、請求項1又は2に記載の鑑別用組み合わせマーカ。

[請求項4] 前記アルツハイマー病病態がアルツハイマー病 (AD)、軽度認知障害 (MCI)、及び健常対照 (NC) からなる、請求項1～3のいずれか1項に記載の鑑別用組み合わせマーカ。

[請求項5] 前記NCをMCI移行型健常対照 (pre-MCI) 及びMCI非移行型健常対照 (non-pre-MCI) にさらに鑑別する、請求項4に記載の鑑別用組み合わせマーカ。

[請求項6] アルツハイマー病病態の鑑別キットであって、
請求項1～5のいずれか1項に記載のアルツハイマー病病態の鑑別用組み合わせマーカのそれぞれに特異的に結合する、ペプチド結合分子及び糖鎖結合分子を含み、
前記ペプチド結合分子が特異的に結合するポリペプチドがTfタンパク質、PGDS、及びtauタンパク質からなる群から選択されるいずれか一以上であり、
前記糖鎖結合分子が特異的に結合する糖鎖が非還元末端にマンノースを有する糖鎖及び／又は非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖である
前記鑑別キット。

[請求項7] 前記ペプチド結合分子が抗体若しくはその活性断片、又はアプタマーである、請求項6に記載の鑑別キット。

[請求項8] 前記糖鎖結合分子がレクチン、抗体若しくはその活性断片、及びアプタマーからなる群から選択される、請求項6又は7に記載の鑑別キット。

[請求項9] アルツハイマー病病態の鑑別方法であって、
認知症の疑いのある被験者から得た所定量の体液中に存在する、請求項1～5のいずれか1項に記載のアルツハイマー病病態の鑑別用組み合わせマーカにおけるそれぞれのマーカの量を、該マーカの

ポリペプチドに特異的に結合するペプチド結合分子及び該マーカの糖鎖に特異的に結合する糖鎖結合分子を用いて測定し、その測定値を得る工程、前記それぞれのマーカの測定値を乗じて得られる積値を得る工程、及び

予め設定されたADカットオフ値及びMCIカットオフ値に基づいて前記積値から前記被験者がAD、MCI、及びNCのいずれに該当し得るかを判定する工程

を含む前記鑑別方法。

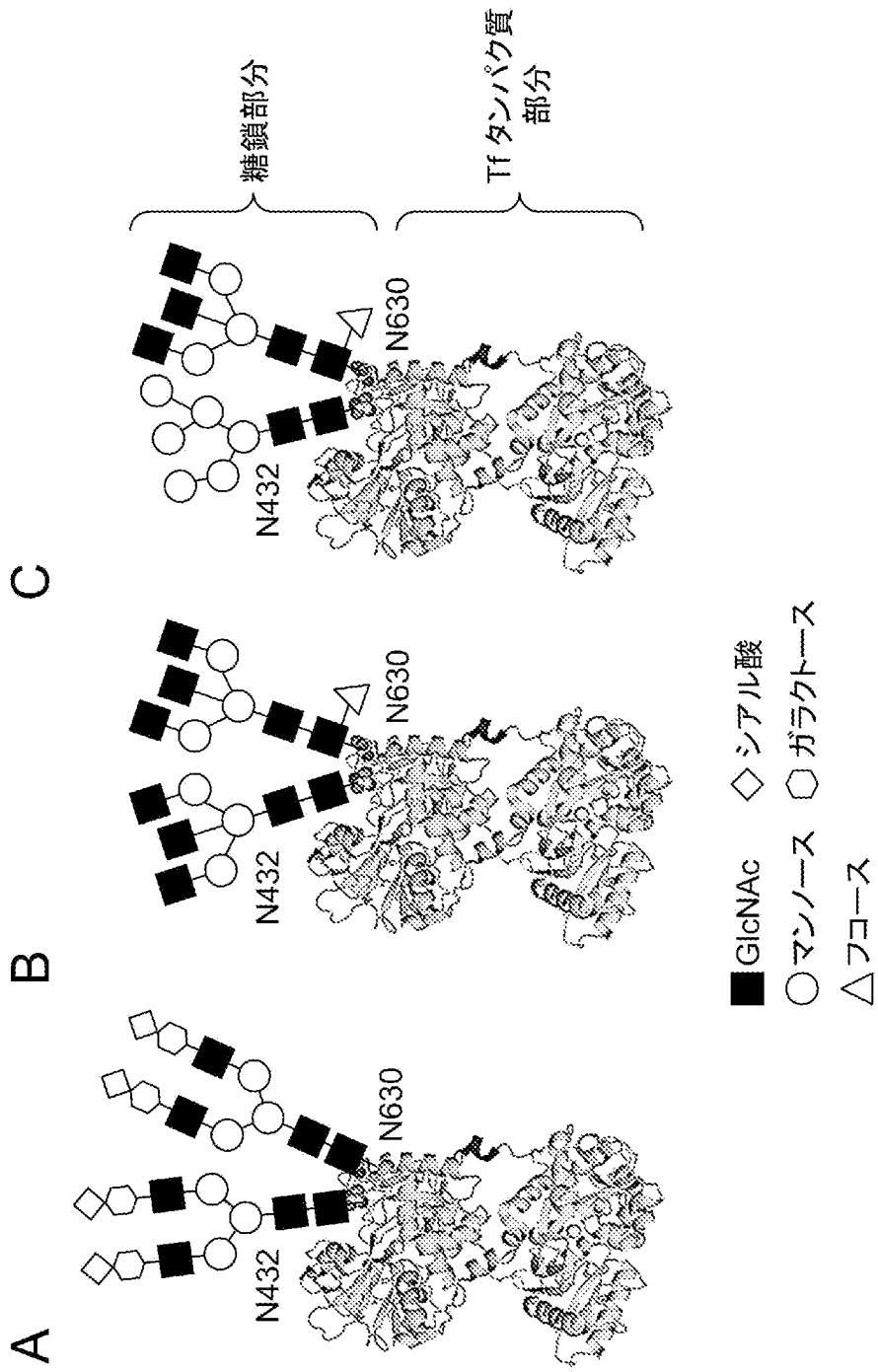
[請求項10]

MCI移行型健常対照の鑑別方法であって、

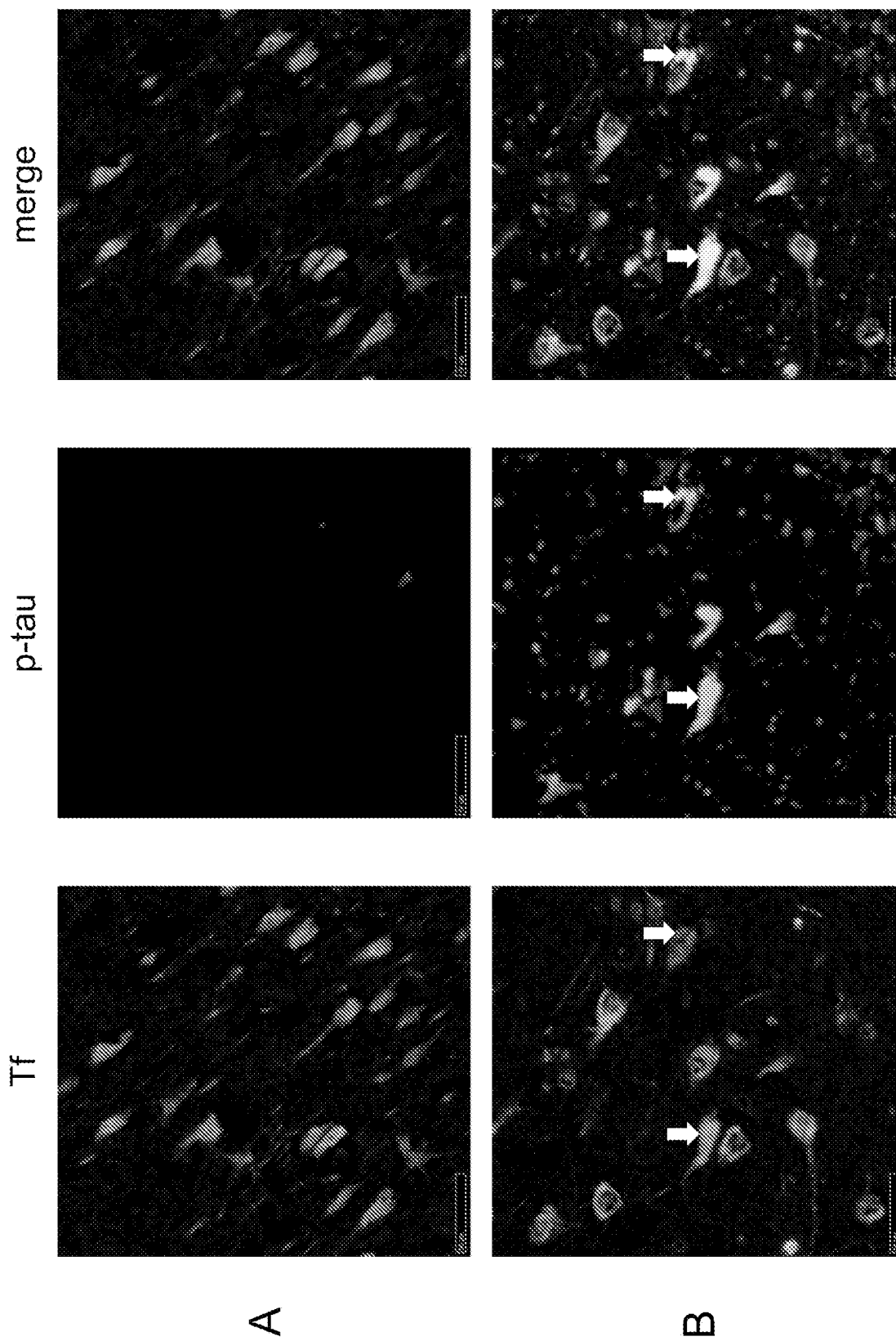
予め設定されたpre-MCIカットオフ値に基づいて請求項9に記載のアルツハイマー病病態の鑑別方法でNCに該当すると判定された被験者の前記積値から前記被験者がpre-MCI及びnon-pre-MCIのいずれに該当し得るかを判定する工程

を含む前記鑑別方法。

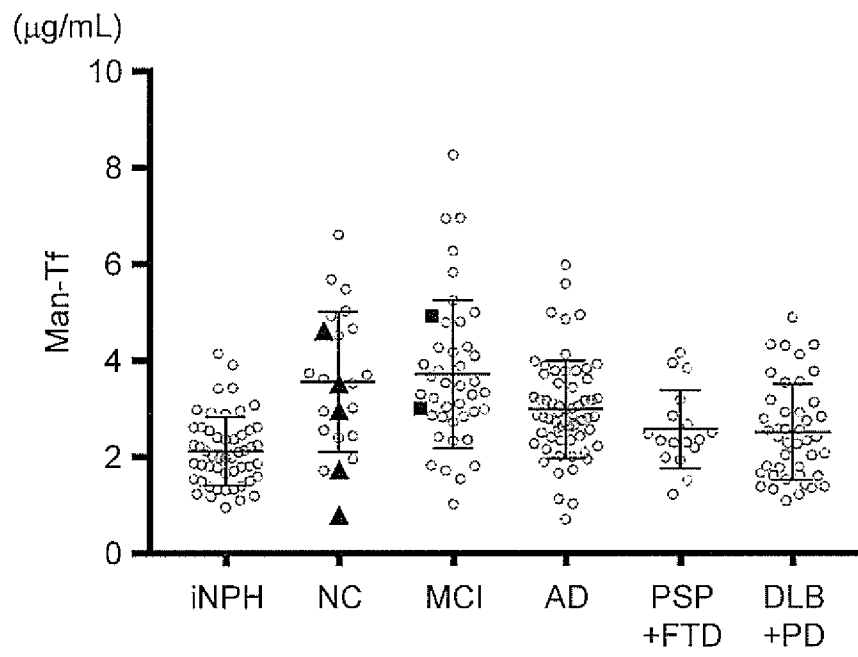
[図1]



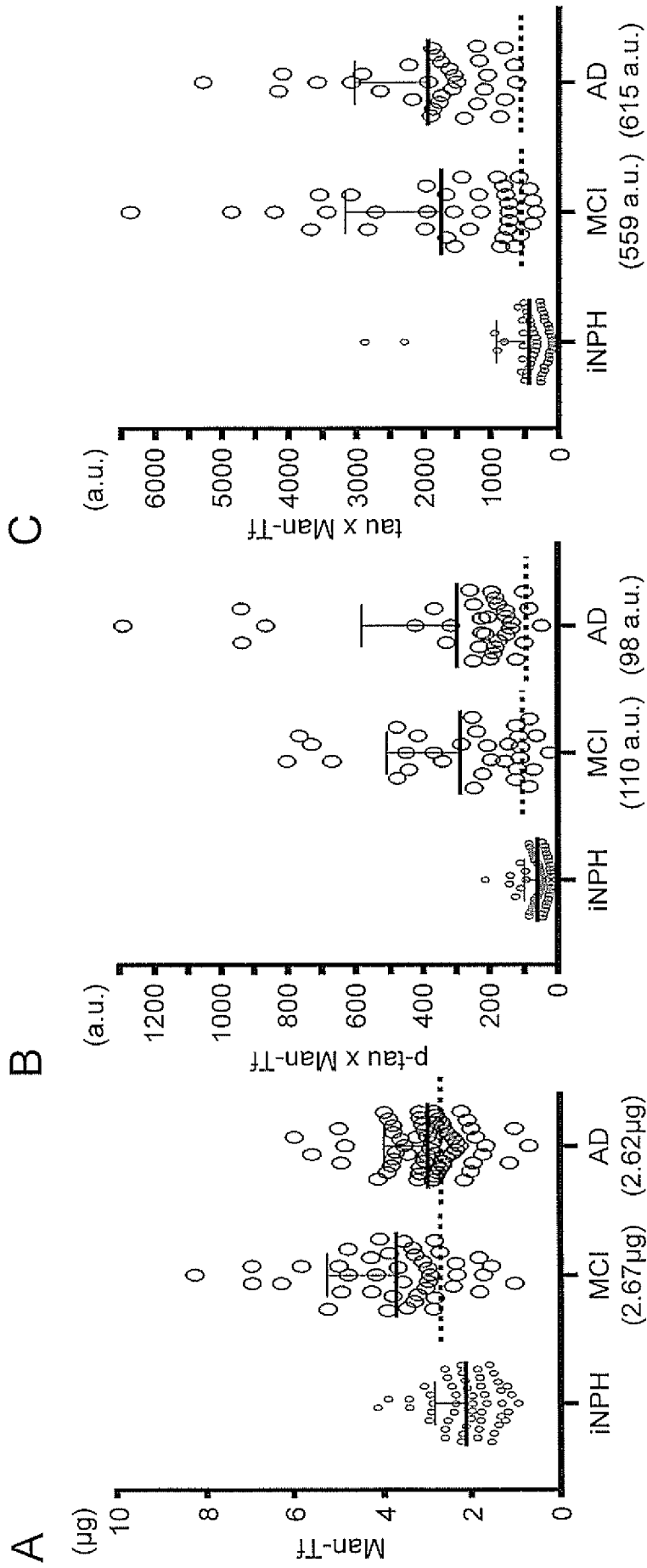
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/032787

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>C07K 14/47(2006.01)i; C07K 14/79(2006.01)i; C12N 15/115(2010.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; C12N 9/90(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i FI: G01N33/68 ZNA; G01N33/53 D; G01N33/53 V; C12N15/115 Z; C07K14/79; C07K14/47; C12N9/90; C12Q1/68</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K14/47; C07K14/79; C12N15/115; C12Q1/68; C12N9/90; G01N33/53; G01N33/68		
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 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
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 (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/195778 A1 (FUKUSHIMA MEDICAL UNIVERSITY) 16 November 2017 (2017-11-16) claims, paragraph [0129], fig. 9	1, 3-4, 6-8
A		5, 9-10
A	WO 2008/029886 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOTTORI UNIVERSITY) 13 March 2008 (2008-03-13) entire text, all drawings	1, 3-10
A	JP 2015-4664 A (MAGQU CO., LTD.) 08 January 2015 (2015-01-08) entire text, all drawings	1, 3-10
A	WO 2019/022064 A1 (NIPRO CORPORATION) 31 January 2019 (2019-01-31) entire text, all drawings	1, 3-10
A	JP 2007-524847 A (CIPHERGEN BIOSYSTEMS, INC.) 30 August 2007 (2007-08-30) entire text, all drawings	1, 3-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 24 November 2021		Date of mailing of the international search report 07 December 2021
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

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:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
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 forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The feature set forth in claim 1, of a combination marker for differentiating pathological conditions of Alzheimer's disease does not make a contribution over the prior art in light of the content disclosed in document 1 (see paragraph [0129], fig. 9, etc.), and thus this feature cannot be said to be a special technical feature.

Claims 1-10 set forth at least nine independent inventions below, which are based on the marker combinations.

(Invention 1) Claims 1, 3-10: Aspects of claims 1 and 3-10, in which a combination of: a transferrin glycoprotein (Man-Tf protein) containing at least one sugar chain having mannose on a non-reducing end or a fragment thereof including the sugar chain having mannose; and one polypeptide selected from the group consisting of a tau protein, a phosphorylated tau protein (p-tau protein), and fragments thereof, is used.

(Inventions 2-3) Claims 1, 3-10: Aspects of claims 1 and 3-10, in which a combination of: one polypeptide selected from the group consisting of a transferrin glycoprotein (GlcNAc-Tf protein) containing only a sugar chain having N-acetylglucosamine on a non-reducing end or a fragment thereof including the sugar chain having the N-acetylglucosamineone polypeptide, and a prostaglandin D2 synthase (PGDS) or a fragment thereof; and one polypeptide selected from the group consisting of a tau protein, a phosphorylated tau protein (p-tau protein) and fragments thereof, is used.

(Inventions 4-7) Claims 1, 3-10: Aspects of claims 1 and 3-10, in which a combination of at least two proteins selected from the group consisting of the Man-Tf protein or a fragment thereof including the sugar chain having mannose, the GlcNAc-Tf protein or a fragment thereof including the sugar chain, and the PGDS or a fragment thereof, is used.

(Inventions 8-9) Claims 1-10: Aspects of claims 1-10, in which a combination of: the Man-Tf protein or a fragment thereof including the sugar chain having mannose, or the GlcNAc-Tf protein or a fragment thereof including the sugar chain having N-acetylglucosamine; and ADindex, is used.

Document 1: WO 2017/195778 A1 (FUKUSHIMA MEDICAL UNIVERSITY) 16 November 2017 (2017-11-16), entire text, all drawings

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Claims 1, 3-10 (Invention 1)**

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/032787

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2017/195778	A1	16 November 2017	US 2019/0113528 A1 claims, paragraph [0175], fig. 9 EP 3457133 A1	
WO	2008/029886	A1	13 March 2008	US 2011/0065197 A1 entire text, all drawings	
JP	2015-4664	A	08 January 2015	US 2014/0370518 A1 entire text, all drawings EP 2816353 A1 TW M474138 U ES 2564480 T	
WO	2019/022064	A1	31 January 2019	US 2020/0166525 A1 entire text, all drawings	
JP	2007-524847	A	30 August 2007	US 2005/0244890 A1 entire text, all drawings US 2011/0129920 A1 US 2007/0015221 A1 US 2011/0294865 A1 US 2013/0073308 A1 WO 2005/047484 A2 EP 2369347 A1 EP 2369348 A1	
US	2014/0357525	A1	04 December 2014	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 14/47(2006.01)i; C07K 14/79(2006.01)i; C12N 15/115(2010.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; C12N 9/90(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i FI: G01N33/68 ZNA; G01N33/53 D; G01N33/53 V; C12N15/115 Z; C07K14/79; C07K14/47; C12N9/90; C12Q1/68</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K14/47; C07K14/79; C12N15/115; C12Q1/68; C12N9/90; G01N33/53; G01N33/68</p>										
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年									
<p>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); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
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								
X A	WO 2017/195778 A1 (公立大学法人福島県立医科大学) 16.11.2017 (2017-11-16) 特許請求の範囲, [0129], 図9	1, 3-4, 6-8 5, 9-10								
A	WO 2008/029886 A1 (国立大学法人鳥取大学) 13.03.2008 (2008-03-13) 全文全図	1, 3-10								
A	JP 2015-4664 A (磁量生技股▲ふん▼有限公司) 08.01.2015 (2015-01-08) 全文全図	1, 3-10								
A	WO 2019/022064 A1 (ニプロ株式会社) 31.01.2019 (2019-01-31) 全文全図	1, 3-10								
A	JP 2007-524847 A (サイファージェン バイオシステムズ インコーポレイテッド) 30.08.2007 (2007-08-30) 全文全図	1, 3-10								
A	US 2014/0357525 A1 (DUKE UNIVERSITY) 04.12.2014 (2014-12-04) 全文全図	1, 3-10								
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 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</p>										
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日									
24.11.2021	07.12.2021									
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） 三好 貴大 2J 6200 電話番号 03-3581-1101 内線 3250									

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1に記載される、アルツハイマー病病態の鑑別用組み合わせマーカーという技術的特徴は、文献1（[0129]、図9等参照）の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものでないから、当該技術的特徴は特別な技術的特徴であるとは言えない。

してみると、請求項1-10には、マーカーの組み合わせに基づいて、以下少なくとも9個の独立した発明が記載されている。

（発明1）請求項1、3-10：非還元末端にマンノースを有する糖鎖を少なくとも1つ含むトランスフェリン糖タンパク質（Man-Tfタンパク質）又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、及び、タウタンパク質（tauタンパク質）、リン酸化タウタンパク質（p-tauタンパク質）及びそれらの断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチドの組み合わせを用いる部分。

（発明2-3）請求項1、3-10：非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖のみを含むトランスフェリン糖タンパク質（GlcNAc-Tfタンパク質）又は前記N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を含むその断片、及びプロスタグランジンD2合成酵素（PGDS）又はその断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチド、及び、タウタンパク質（tauタンパク質）、リン酸化タウタンパク質（p-tauタンパク質）及びそれらの断片からなる群から選択されるいずれか一のポリペプチドの組み合わせを用いる部分。

（発明4-7）請求項1、3-10：前記Man-Tfタンパク質又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、前記GlcNAc-Tfタンパク質又は前記糖鎖を含むその断片、及び前記PGDS又はその断片からなる群から選択される少なくとも2以上のタンパク質の組み合わせを用いる部分。

（発明8-9）請求項1-10：前記Man-Tfタンパク質又は前記マンノースを有する糖鎖を含むその断片、又は前記GlcNAc-Tfタンパク質又は前記N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を含むその断片、及びADindexの組み合わせを用いる部分。

文献1：WO 2017/195778 A1（公立大学法人福島県立医科大学）16.11.2017（2017-11-16）

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。
請求項1、3-10（発明1）

- 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

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/JP2021/032787

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2017/195778	A1	16.11.2017	US	2019/0113528	A1	
				特許請求の範囲, [0175], 図9			
				EP	3457133	A1	

WO	2008/029886	A1	13.03.2008	US	2011/0065197	A1	
				全文全図			

JP	2015-4664	A	08.01.2015	US	2014/0370518	A1	
				全文全図			
				EP	2816353	A1	
				TW	M474138	U	
				ES	2564480	T	

WO	2019/022064	A1	31.01.2019	US	2020/0166525	A1	
				全部全図			

JP	2007-524847	A	30.08.2007	US	2005/0244890	A1	
				全文全図			
				US	2011/0129920	A1	
				US	2007/0015221	A1	
				US	2011/0294865	A1	
				US	2013/0073308	A1	
				WO	2005/047484	A2	
				EP	2369347	A1	
				EP	2369348	A1	

US	2014/0357525	A1	04.12.2014	(ファミリーなし)			
