明　細　書

発明の名称 ：

認知機能障害疾患のバイオマーカー及び当該バイオマーカーを用いる認知機能障害疾患の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、軽度認知障害およびアルツハイマー病を含む認知機能障害疾患の検出に用い得る新規なタンパク質およびペプチドであるバイオマーカーおよび該バイオマーカーを用いる認知機能障害疾患の検出方法に関する。

背景技術

[0002] 生体の正常と正常以外の状態を呈する試料を用いてその差異を判別する手段としては、一般的には体外診断薬において用いられてきた技術が主たる従来技術である。

体外診断薬のうち最も多いのが、血液中の成分をバイオマーカーとして分析することで診断検査を行うものである。

本分野における従来技術では、血液中の単独の特定のタンパク質若しくは分子量１万以下のいわゆるオリゴペプチドの存在量の測定、又は酵素タンパク質の場合は活性の測定を行って、正常(健常人)試料と疾患試料との明らかな差をもって診断の一助としてきた。

すなわち、あらかじめ一定数の健常人と疾患患者由来の生体試料における単独若しくは複数の特定のタンパク質若しくは特定のオリゴペプチドの量又はこれらの活性量を計測し、異常値と正常値の範囲を決める。次いで、評価する生体試料を同様の方法で測定し、測定結果がこの決まった異常値と正常値のどちらの範囲に属するかによって検査評価を行うものである。

[0003] 具体的な計測方法としては、試料をそのまま、又はあらかじめ希釈しておき、単独又は複数の特定のタンパク質若しくはペプチドの量を、基質と反応させると発色する酵素によって標識された特異的１次抗体若しくは２次抗体を用いて、試料の発色量で計測する酵素結合免疫吸着測定法(ELISA; Enzyme

Linked Immmunosorbent Assay)や化学発光測定法(CLIA; ChemiLuminescent Immunoassay)などがある。また、当該特定のタンパク質若しくはペプチドの量を、１次抗体又は２次抗体に結合させたラジオアイソトープを用いて、計測する放射性免疫測定法(RIA; RadioImmunoassay)、タンパク質が酵素の場合は直接基質を与えて産生物を発色などで計測する酵素活性測定法などがある。

[0004] また、酵素の基質分解産物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析する方法もある。また、HPLCと質量分析装置を組み合わせたLC-MS/MS法ならびにこれを用いたselected reaction monitoring (SRM)/multiple reaction monitoring (MRM)法もある。

また、試料に適当な前処理を施した後、２次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(2D-PAGE)を行ってタンパク質又はペプチドを分離した後、目的のタンパク質又はペプチドについて、銀染色、クマシーブルー染色、あるいは対応する抗体を用いた免疫染色(ウエスタン・ブロッティング)を行って、試料中の濃度を測定する方法もある。

また、生体試料をカラムクロマトグラフィーによって分画し、その画分に含まれるタンパク質とペプチドを質量分析によって分析する手法がある。

また、カラムクロマトグラフィーではなく、前処理としてプロテインチップを用いて質量分析する方法や、前処理として磁気ビーズを用いて質量分析する方法がある。

[0005] さらに、本発明者は、ビーズ(磁気ビーズを含む)に対象となるタンパク質又はペプチドに対する抗体を結合させ、これにより測定したいタンパク質又はペプチドを捕捉したのち、ビーズから溶出して質量分析により測定するimmunoMS法を開発している。

また、インタクトなタンパク質の解析を目的としてトリプシンなどで分解した後、上記の方法で質量分析まで行う方法も報告されている（特許文献１参照）。

しかし、いずれもインタクトなタンパク質の性質を利用して、そのまま分画し、又は特異的に吸着するタンパク質分子を選別して質量分析で解析する

ものである。

[0006] アルツハイマー病を主とする認知機能障害疾患は、我が国においても近年の高齢化に伴って急激に増加している。1995年に約130万人であったが、2010年には約280万人となり、2020年には約410万人に達すると予想されている。アルツハイマー病は認知機能障害疾患の60～90%を占めると言われている。本疾患は患者の記憶を喪失させるのみでなく人格をも崩壊して患者の社会生活機能を喪失させてしまうことから、社会問題化しつつある。

本邦においては1999年末に抗アセチルコリンエステラーゼ阻害薬である塩酸Donepezilが認可を受け、早期に投与されれば高い確率で認知機能の低下を「遅らせる」ことができるようになった。アルツハイマー病においては、現状の治療法やこれから開発される治療薬効果をあげるためには早期に診断することが最重要の課題となっている。

[0007] 米国精神医学会によるアルツハイマー病の主たる診断基準(DSM IV)を以下に示す。

A. 多彩な認知欠損の発現で、以下の両方により明らかにされる。

(1)記憶障害(新しい情報を学習したり、以前に学習した情報を想起する能力の障害)

(2)以下の認知障害の一つ又はそれ以上

a)失語(言語の障害)

b)失行(運動機能の障害がないにもかかわらず、動作を行う能力の障害)

c)失認(感覚機能の障害がないにもかかわらず、対象を認識又は同定する能力の障害)

d)実行能力(計画を立てる・組織化する・順序だてる・抽象化する)の障害

B. 基準A(1)およびA(2)の認知欠損は、その各々が社会的又は職業的機能の著しい障害を引き起こし、病前の機能水準から著しい低下を示す(非特許文献１)。

[0008] アルツハイマー病(Alzheimer disease)(AD)の関連疾患にはいろいろなもの

がある。ADなどの認知症は徐々に認知機能の低下が出現するため、認知症の前駆状態と呼ぶべき状態が存在する。このような状態を軽度認知障害(mild cognitive impairment)(MCI)と呼んでいる。米国のデータでは物忘れ外来を受診したMCIのうち、1年に10-15%、4年間でおよそ50%がADに移行するという。ADの前駆状態の大部分は健忘型MCIに含まれる。

現在の定義によると、MCIは認知機能の低下に関する訴えが聞かれるが、基本的な日常生活には支障がない状態とされる。前頭側頭型認知症(FTD)は認知機能低下とともに周囲を気にせずわが道を行く行動が特徴的で、周囲に合わせようとするADと対照的である。FTDには大脳皮質に組織学的にPick球の存在を認めるPick病が含まれる。

レビー小体型認知症(DLB)は、記憶障害が進行性であり幻視などの視覚認知障害があることを特徴としている。臨床症状からの診断では認知症の10～30%がDLBであり、老年期の変性性認知症疾患ではアルツハイマー型認知症(AD)に次いで2番目に多いとされる。組織学的には大脳におけるレビー小体の存在を特徴とする。FTD及びDLBは認知症を認め痴呆型であるので痴呆型神経疾患とも呼ばれる(非特許文献１)。

[0009] 認知症の診断に広く用いられている検査は、改訂長谷川式知能評価スケール(HDS-R)とMMSE (Mini-Mental State Examination)で、被験者への問診を行い、その結果から判断するものである。HDSは1991年に改訂されてHDS-Rと称されるようになった。

これは９項目の質問からなり、見当識、記銘力、計算能力、記憶・想起および常識をテストするものである。30点満点で23点以下を認知症の疑いありとする。また、MMSEは痴呆の診断のために米国で考案されたもので、見当識、記憶力、計算力、言語的能力、図形的能力などをカバーする。30点満点で11の質問からなり、HDS-Rと同様に23点以下で認知症の疑いありとする。両テストの結果は割合によく一致するとされている。これらの問診法はあくまでスクリーニングの目的で用いられ、確定診断に至ることはないし、HDS-R、MMSEともに重症度分類に用いられることはない(非特許文献１)。

[0010] 画像診断法としては、脳萎縮・脳溝脳室拡大など、脳の形態的異常を見るCT・MRIと脳血流量を見る脳血流シンチグラフィ(SPECT)および酸素消費量・ブドウ糖消費量を見るポジトロン断層法(PET)がある。SPECTおよびPETは核医学的方法で、形態的異常の起きる前に異常を検出することができるとされている(非特許文献１)。しかし、これらの画像診断は特殊な設備を必要とするため、すべての医療機関で実施することができないという欠点を有する。また画像を見る医師によって判断が異なることがあり、客観性に欠ける。

[0011] このようにADを含む認知症の診断は、客観性を欠く、かつ高価な装置の使用を前提とした方法に依存しているのが現状であり、疾患発見のためのスクリーニングは不可能である。ここに血液(血清、血漿を含む)のような容易に得られる患者の試料を用いて客観的診断を可能にするバイオマーカーが見出されるならば、スクリーニングを行うことによって、現在最重要の課題となっている認知機能障害疾患の早期発見が可能となる。

[0012] 特許文献１には、同一担癌哺乳動物に由来する複数の血清サンプルに含まれるアポリポタンパク質A-IIの定量値を前記サンプル間で相互比較することを特徴とする、前記担癌哺乳動物血清中のアポリポタンパク質A-II量の変化を検出する方法が開示されている。

特許文献２には、当該文献２記載の配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲンα鎖等からなる群から選択される少なくとも１つのタンパク質又はペプチドからなる肝がん検出のための肝がんバイオマーカーが開示されている。

特許文献３－５には、認知機能障害疾患診断のためのバイオマーカーが開示されている。特許文献５には、当該文献５記載の配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるComplement C3、当該文献５記載の配列番号１５で表されるアミノ酸配列からなるTransthyretin等から選択される少なくとも１つのタンパク質若しくはペプチド、又は当該タンパク質若しくはペプチドから生じるアミノ酸残基５個以上のペプチド断片からなる、認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：特開2004-333274号公報

特許文献2：特開2006-308533号公報

特許文献3：特開2010-271078号公報

特許文献4：特開2012-037349号公報

特許文献5：特開2012-132808号公報

非特許文献

[0014] 非特許文献1：中野今治、水澤英洋編集：よくわかるアルツハイマー病、2004、永井書店

非特許文献2：N. Benkiraneら、J. Biol. Chem. Vol. 268, 26279-26285, 1993.

非特許文献3：Czepiel, SA, http://czep.net/stat/mlelr.pdf, 2010, Maximum likelihood estimation of logistic regression models: theory and implementation.

非特許文献4：Bowling, SR, et al. JIEM, 2009, 2: 114-127, A logistic approximation to the cumulative normal distribution.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0015] 本技術は、バイオマーカー及び該バイオマーカーを用いた認知機能障害疾患の検出方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明者は、非認知機能障害被験者及び認知機能障害疾患患者における、存在の有無及び存在量が異なるタンパク質及びその部分ペプチドを探索した。

そして、本発明者は、鋭意検討を行った結果、認知機能障害疾患を検出することができる３種のポリペプチドを血清中に見出した。当該３種のポリペ

プチドは、（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるApolipoprotein A1由来のペプチド、（ｂ）配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるTransthyretin由来のペプチド及び（ｃ）配列番号３で表されるアミノ酸配列からなるComplement C3由来のペプチドであった。

さらに、本発明者は、認知機能障害疾患の検出の際に正答率の高いバイオマイカーの組み合わせについてロジスティック回帰分析で解析した。この結果、このうちの前記（ｃ）Complement C3由来のペプチドと、前記（ｂ）Transthyretin由来のペプチド又は前記（ａ）Apolipoprotein A1由来のペプチドとの２種のペプチドを組み合わせて用いることで、認知機能障害疾患（特に軽度認知機能障害及びアルツハイマー病）の検出精度を高めることができることを見出した。

[0017] 本技術において、非認知機能障害被験者（NDC）は、健常人を含み、何らかの疾患に罹患してもよいが認知機能障害疾患には罹患していない被験者（non-demented control）を意味するものである。

また、本技術において、認知機能障害疾患と総称するとき、軽度認知機能障害（MCI）、アルツハイマー病（AD）及び痴呆型神経疾患を含むものとする。本技術において、軽度認知機能障害（MCI）、アルツハイマー病（AD）が好適に検出することができる。

本技術において見出された当該ペプチドは血清中のみならず、血液、血清、血漿、脳髄膜液、尿等の他の生体試料中に検出される場合もバイオマーカーとして意義をもつものである。同時に、これらペプチドの起源であるタンパク質（以下、「インタクトなタンパク質」と称する）又はペプチドも、バイオマーカーとしての意義を持つ。

[0018] すなわち、本技術は、次の（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）から選択される１種又は２種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを提供するものである。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むApolipoprotein A1のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出

するためのバイオマーカー

（ｂ）配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretinのインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｃ）配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むComplement C3のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

[0019] 本技術は、生体試料中の、上述の（ａ）バイオマーカー、（ｂ）バイオマーカー及び（ｃ）バイオマーカーから選択される１種又は２種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを同時又は別々に測定する認知機能障害疾患の検出方法を提供するものである。

[0020] 本技術は、上述の（ａ）バイオマーカー、（ｂ）バイオマーカー及び（ｃ）バイオマーカーから選択される１種又は２種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを測定するための認知機能障害疾患の検出キットを提供するものである。

[0021] 本技術は、被験者の生体試料中の認知機能障害疾患の２種以上のバイオマーカーをそれぞれ測定すること、 前記２種以上のバイオマーカーのそれぞれの測定結果をロジスティック回帰分析で解析すること、 前記解析結果に基づき認知機能障害疾患の正答率の高いバイオマーカーの組み合わせを選定すること、 を含む、正答率が高い複数の認知機能障害疾患検定用バイオマーカーの組み合わせ選定方法を提供するものである。

発明の効果

[0022] 本技術により、バイオマーカー及び該バイオマーカーを用いた認知機能障害疾患の検出方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]配列番号３；C3のマーカータンパク質について、差異解析とROC曲線の結果。NDC vs. MCIとNDC vs. ADを示す図である。

[図2]配列番号１；ApoA1のマーカータンパク質について、差異解析とROC曲線

の結果。NDC vs. MCIとNDC vs. ADを示す図である。

[図3]配列番号２；TTRのマーカータンパク質について、差異解析とROC曲線の結果。NDC vs. MCIとNDC vs. ADを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0024] 本技術において、次の（ａ）～（ｃ）記載のインタクトなタンパク質及び／又はこの部分ペプチドから選択される１種以上のバイオマーカーを、認知機能障害疾患を検出するために用い得る。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むApolipoprotein A1のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｂ）配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretinのインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｃ）配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むComplement C3のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

[0025] 本技術は、被験者が認知機能障害疾患に罹患しているときに、生体試料中の、前記（ａ）～（ｃ）記載のうちの少なくとも１つのインタクトなタンパク質及び／又はその部分ペプチドの種類及び量をそれぞれ検出することができる。

さらに、本技術は、生体試料中の前記（ａ）～（ｃ）記載のうちの少なくとも１つ又は２つ以上のインタクトなタンパク質とその部分ペプチドを検出すると同時に、これらの種類と量の変動を測定することにより、被験者が認知機能障害疾患に罹患しているかどうかをより精度よく診断することができる。

本技術は、生体試料中の前記（ａ）～（ｃ）のバイオマーカーから選ばれる１種又は２種以上を測定することで、精度及び特異性の両方が極めて高い診断等のシステムを提供することができる。これによって、認知機能障害疾

患に対して精度の高い診断等を行うことができる。さらに、本技術のバイオマーカーは、薬剤効果判定においても有用性が高い。

また、本技術は、前記（ａ）～（ｃ）の各バイオマーカーの量を計測することにより、被験者の生体試料中の前記（ａ）～（ｃ）のインタクトなタンパク質及び／又はその部分ペプチドの出現又は増加する場合には、当該被験者は軽度の認知障害又はアルツハイマー病を含む認知機能障害疾患に罹患していると、検出、評価、判別、診断又は検査等を行うことができる。また、本技術は、さらに非認知機能障害被験者の生体試料と比較することにより、被験者が認知機能障害疾患に罹患しているかどうかをより精度よく診断等を行うことができる。

[0026] 好ましくは、前記（ａ）～（ｃ）のバイオマーカーを２種又は３種以上組み合わせて認知機能障害疾患を検出することが、認知機能障害疾患の検出精度が向上するので、好適である。複数のバイオマーカーを検出した場合には、認知機能障害疾患であると精度よく検出又は診断することができる。

より好ましくは、前記（ｃ）バイオマーカー(C3)と、前記（ａ）バイオマーカー(ApoA1)又は前記（ｂ）バイオマーカー(TTR)との２種を測定するのが、認知機能障害疾患（MCI及びAD）の検出精度が向上するので、好適である。この２つのバイオマーカーを検出した場合には、、認知機能障害疾患（MCI及びAD)

さらに検出精度が向上するので、前記認知機能障害疾患の検出が軽度認知障害の検出である場合、前記（ｃ）バイオマーカー(C3)及び前記（ａ）バイオマーカー(ApoA1)の２種を測定するか、又は、前記認知機能障害疾患の検出がアルツハイマー病の検出である場合、前記（ｃ）バイオマーカー(C3)及び前記（ｂ）バイオマーカー(TTR)の２種を測定するのが、より好適である。

[0027] ここで、本技術の「インタクトなタンパク質の部分ペプチド」の「ペプチド」には、「ポリペプチド」と「オリゴペプチド」が含まれる意味である。

当該「オリゴペプチド」は一般的には分子量１万以下のアミノ酸が結合したものをいい、又はアミノ酸残基の数として数個～５０個以下程度のものを

いう。

当該「ポリペプチド」は、分子量１万以上のアミノ酸が結合したものをいい、又はアミノ酸残基の数として５０個以上程度のものをいう。

本技術において、インタクトなタンパク質の部分ペプチドとは、インタクトなタンパク質が有するアミノ酸配列の一部の部分的アミノ酸配列を有するペプチドをいう。

このインタクトなタンパク質の部分ペプチドは、転写・翻訳による発現合成過程で部分ペプチドとして生成される場合と、インタクトなタンパク質として合成された後に、生体内で消化分解を受けて消化分解産物ペプチドとして生成される場合がある。この原因として、生体が認知機能障害疾患等の正常以外の状態にあるときに、タンパク質の合成及び制御機構が脱制御されることが挙げられる。

本技術は、生体内タンパク質の発現合成及び／又は消化分解を指標として被験者が正常状態であるか認知機能障害疾患に罹患しているかを評価、判別等を行うことができ、また認知機能障害疾患に罹患している場合の進行度をも評価、判別等を行うことができる。

本技術における「認知機能障害疾患の検出」とは、被験者が認知機能障害疾患に罹患しているかどうかの検出であり、この他評価、判別、診断又は検査等であってもよい。また、本技術の認知機能障害疾患の検出は、被験者がより重篤な認知機能障害に罹患するリスクの評価等も含み得る。

[0028] 本技術において、認知機能障害疾患検出のためのバイオマーカーとして用い得るインタクトなタンパク質として、配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むApolipoprotein A1、配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretin、配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むComplement C3が挙げられる。

また、これらインタクトなタンパク質の部分ペプチドも、認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーとして用い得る。

本技術における「インタクトなタンパク質の部分ペプチド」には、インタ

クトなタンパク質及びその合成・分解過程で生成されるペプチドから生じるアミノ酸残基５個以上のペプチド断片も含む意味である。

[0029] また、認知機能障害疾患検出のためのバイオマーカーとして用い得るインタクトなタンパク質の部分ペプチドとして、例えば、配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（好適にはApolipoprotein A1由来ポリペプチド）、配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（好適にはTransthyretin由来ポリペプチド）、配列番号３で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（Complement C3由来ポリペプチド）が挙げられる。

本技術は、前記（ａ）～（ｃ）に記載のタンパク質及びこの部分ペプチドの各アミノ酸配列において、１個又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加したアミノ酸配列からなるタンパク質又はペプチドをバイオマーカーとして用いることができる。

ここで、「１個又は数個」とは、「１～３個」、「１又は２個」、「１個」をいう。

本技術においてバイオマーカーに用いる部分ペプチドは、配列番号１～３で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質若しくはペプチド、及びこれらから生じるアミノ酸残基５個以上のペプチド断片も含む意味である。

[0030] なお、本技術における「アミノ酸残基５個以上のペプチド断片」において「アミノ酸残基５個以上」とした理由は、非特許文献２の記載による。当該非特許文献２は、ヒストンH3のC端(130～135)のアミノ酸残基配列IRGERAについてRをKに置換したペプチドおよびIRを欠失させ、代わりにCGGをGERAに結合させたペプチドCGGGERAがペプチドIRGERAを免疫原として得た抗体によって認識されたとの報告である。これは、抗原性の認識が４個以上のアミノ酸残基からなるペプチドによってなされることを示している。

本技術では、ヒストンH3のC端以外にも一般性を持たせるために、残基数を１つ増やして、５個以上としたが、このような低分子のペプチドをも対象とすることは、イムノ・ブロット法、ELISA法、immunoMS法などのような免疫学的手法を用いて検出及び分別する方法を用いるときに重要である。

[0031] なお、インタクトなタンパク質又はその部分ペプチドに糖鎖が付加されることがある。これらの糖鎖が付加したタンパク質及び部分ペプチドも認知機能障害疾患検出のためのバイオマーカーとして用い得る。

[0032] なお、本技術において、バイオマーカーを定量してもよいし、定性により存在若しくは非存在を決定してもよい。このとき、バイオマーカー濃度が所定の測定値以上であった場合又は非認知機能疾患患者群の標準値以上であった場合には、認知機能障害疾患であると検出、診断等を行うことができる。また、バイオマーカー定性により、陽性ー陰性と検出、診断等を行うことができ、例えば、バイオマーカーと反応し発色等を示したときは、陽性とする。

[0033] 本技術で血清等の生体試料中のバイオマーカーを分離する方法としては、２次元電気泳動又は２次元クロマトグラフィー(2D-LC)を用い得る。２次元クロマトグラフィーに用いるクロマトグラフィーは、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等の公知のクロマトグラフィーから選択すればよい。

また、本技術でバイオマーカーを分離する方法として、クロマトグラフィー(LC)と三連四重極質量分析を組み合わせたLC-MSを用いたSRM/MRM法で定量することもできる。この時用いるLCは1次元のLCでもよい。

さらに、本技術でバイオマーカーを分離する方法として、本発明者が開発したビーズ（磁気ビーズを含む）に対象となるタンパク質またはペプチドに対する抗体を結合させ、これにより測定したいタンパク質又はペプチドを捕捉したのち、ビーズから溶出して質量分析により測定するimmunoMS法（特許文献１参照）を用いれば、２次元電気泳動又はクロマトグラフィーを用いることなく、簡便に目的のタンパク質、タンパク質断片、ペプチドの有無あるいは量を評価することができる。

[0034] 生体試料中の１種又は２種以上のタンパク質の種類及び量は、種々の方法で、同時又は別々に測定することができる。対象となるタンパク質（タンパク質断片及びその部分ペプチドを含む）が特定されていて、それに対する抗

体（１次抗体）が得られている場合は、以下の方法を用いることができる。

本技術は、イムノ・ブロット法；ウェスタン・ブロット法；酵素若しくは蛍光若しくは放射性物質標識法；質量分析法；immunoMS法；表面プラズモン共鳴法の何れか１つ以上の方法により測定することが好適である。

また、本技術のバイオマーカーは、種類や量が異なる場合でも、同時又は別々に測定することが可能である。

本技術は、これらタンパク質やペプチド又はペプチド断片を、２次元クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせた2D-LC-MALDI-TOF-MS法、SRM/MRM法、immunoMS法を用いることにより、一度に多数のタンパク質又はそれら部分ペプチドを測定することがより好適である。

ここで、本技術において、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA; Enzyme Linked Immmunosorbent Assay)、化学発光測定法(CLIA; ChemiLuminescent Immunoassay)、放射性免疫測定法(RIA; RadioImmunoassay)、酵素活性測定法等を用いる方法を酵素若しくは蛍光若しくは放射性物質の標識法」という。抗体を用いるこれらの方法を「酵素若しくは蛍光若しくは放射性物質標識抗体法」という。

[0035] １．イムノ・ブロット法

最も単純な方法である。数段階に希釈した被験血清を用意し、その一定量（１マイクロリットル前後）をニトロセルローズ・メンブレンなどの適当なメンブレンに滴下し、風乾する。BSAなどのタンパク質を含むブロッキング溶液で処理した後、洗浄し、１次抗体を反応させ、洗浄後１次抗体を検出するための標識された２次抗体を反応させる。メンブレンを洗浄後、標識を可視化して濃度を測定する。

[0036] ２．ウェスタン・ブロット法

等電点又はSDS-PAGEを含む１次元若しくは２次元ゲル電気泳動を行った後で、分離されたタンパク質を一旦、PVDFメンブレンなどの適当なメンブレンに転写し、１次抗体と標識された２次抗体を用いて上述のイムノ・ブロット法と同様に操作して、目的のタンパク質の存在量を測定する。

[0037] ３．ＥＬＩＳＡ法

タンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体をあらかじめ特殊な化学修飾をしたマイクロタイタープレート等の担体に結合させ、試料を段階希釈後、抗体を結合させたマイクロタイタープレートにこれを適当量加えてインキュベーションする。その後洗浄し、捕捉されなかったタンパク質及び部分ペプチドを除く。次に、蛍光若しくは化学発光物質又は酵素を結合させた２次抗体を加えインキュベーションする。

検出は、それぞれの基質を加えた後、蛍光若しくは化学発光物質又は酵素反応による可視光を計測することによって評価判定を行う。抗体の代わりにタンパク質又はその部分ペプチドに結合し得る物質を用いてもよい。例えば、アプタマー等を用いることができる。

本技術は、前記（ａ）～（ｃ）に記載のバイオマーカーに対する物質（例えば、抗体又はアプタマー等）を用いることが好適である。

[0038] さらに以下に方法（特許文献２参照）を例示するが、それらには限定されない。

４．マイクロアレイ（マイクロチップ）を用いた方法

マイクロアレイとは、担体（基板）上に測定しようとする物質に結合し得る物質を整列（アレイ）固定化させたデバイスを総称していう。本技術の場合、タンパク質又は部分ペプチドに対する抗体又はアプタマーを整列固定化させて用いればよい。

測定は、固相化した抗体等に、生体試料を添加し、マイクロアレイ上に測定しようとするタンパク質又は部分ペプチドを結合させ、次に蛍光若しくは化学発光の物質又は酵素を結合させた２次抗体を加えインキュベーションする。検出はそれぞれの基質を加えた後、蛍光もしくは化学発光物質または酵素反応による可視光を計測すればよい。

[0039] ５．質量分析法

質量分析法においては、例えば、特定のタンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体をあらかじめ特殊な化学修飾をしたマイクロビーズ若しくは基

板（プロテインチップ）に結合させる。マイクロビーズは磁気ビーズであってもよい。基板の素材は問わない。

使用する抗体は（１）特定のタンパク質の完全長のみを認識する抗体、（２）部分ペプチドのみを認識する抗体、（３）特定のタンパク質とその部分ペプチドの両方を認識する抗体のすべて、又は上記（１）と（２）、（１）と（３）、若しくは（２）と（３）の組み合わせでもよい。

試料を、原液又は緩衝液で段階希釈後、抗体を結合させたマイクロビーズ又は基板にこれを適当量加え、インキュベーションする。その後洗浄し、捕捉されなかったタンパク質及び部分ペプチドを除く。その後、マイクロビーズ又は基板上に捕捉されたタンパク質及び部分ペプチドをMALDI-TOF-MS、SELDI-TOF-MSなどを用いた質量分析によって分析し、タンパク質、タンパク質断片及び部分ペプチドのピークの質量数とピーク強度を計測する。適当な内部標準物質をもとの生体試料に一定量加えておき、そのピーク強度を測定して、対象となる物質のピーク強度との比を求めることにより、もとの生体試料中の濃度を知ることができる。この方法をimmunoMS法という。

また、試料を原液または緩衝液で希釈又は一部のタンパク質を除去した後、HPLCで分離、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法を用いた質量分析によって定量することができる。その際に、同位体標識した内部標準ペプチドを用いたSRM/MRM法による絶対定量によって資料中の濃度を知ることができる。

[0040] さらに、上記の方法の他、２次元電気泳動を用いた方法、表面プラズモン共鳴を用いた方法等によっても、タンパク質および部分ペプチドを解析することが可能である。

[0041] 本技術は、被験者から採取した生体試料を２次元電気泳動若しくは表面プラズモン共鳴法に供し、前記バイオマーカーの有無又は量を指標に認知機能障害疾患を検出する方法をも包含する。

[0042] 本技術は、上述した生体試料中のバイオマーカーを検出することができる装置（例えば、検出装置、測定装置、解析装置等）をも含む。当該本技術の装置は、抗体又はアプタマー固定部（捕捉部）及び測定部を備えるのが望ま

しい。抗体又はアプタマー固定部は、抗体又はアプタマーを固定化したスライドガラス、96ウェルタイタープレート等の固相担体を有するものであるのが好適である。また、測定部には、分光光度計、蛍光分光計等の検出対象に対応する光検出手段を設けるのが好適である。

さらに、本技術の装置は、得られたデータを解析する解析部を含んでもよく、解析部はデータ処理装置及び解析用ソフトウェアを含むのが好適である。

さらに、本開示の装置に備えられるCPU等を含む制御部又はこれに接続可能なシステム（例えば、パーソナルコンピュータ、コンピュータ・ネットワークシステム等）には、上述した本技術の認知機能障害疾患の検出、診断等の方法を実行可能なプログラム又はこのプログラムを格納した記憶部若しくはシステム等が設けられている。

[0043] 本技術によれば、被験者の認知機能障害を判定することができる。さらに、本技術によれば、被験者の認知機能障害が軽度の段階で評価することもでき、予防医学にも有用である。さらに、認知機能障害疾患に罹患した患者に心理療法や薬物療法を行った場合、障害の進行が抑制されるならば、血清などの生体試料中のタンパク質／部分ペプチドの量にも反映される。これを測定することにより、治療効果の評価と判定を行うこともでき、創薬ターゲット生体分子をスクリーニングを行うこともできる。

[0044] 後記実施例に示すように、本発明者は、多数のペプチドを準備し、各ペプチドに対する各抗体を作成した。これら抗体を用いて、知機能障害疾患の検出用のバイオマーカーの探索を行った。この際、受信者操作特性曲線（ROC曲線）による分析を用いて、各バイオマーカーの有用性について評価を行った。この結果、配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるApolipoprotein A1由来のペプチド、配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretin由来のペプチド、配列番号３で表されるアミノ酸配列からなるComplement C3由来のペプチドが、受信者操作特性曲線（ROC曲線）による分析においてAUC 0.6以上示すマーカーであることを見出した。

さらに、マルチマーカーによる認知機能障害疾患（MCI及びAD）と、非認知機能障害の健常者とが区別できるかどうかを検討した。このとき、ロジスティック回帰分析を利用して検討を行った。

ロジスティック回帰分析の解析結果、Transthyretin及びComplement C3をマルチマーカーとすることで、ほぼ９割と非常に精度の高い認知機能障害疾患の検出を可能とした。

[0045] すなわち、本技術は、（i）被験者の生体試料中の認知機能障害疾患の２種以上のバイオマーカーをそれぞれ測定すること、（ii）前記２種以上のバイオマーカーのそれぞれの測定結果をロジスティック回帰分析で解析すること、（iii）前記解析結果に基づき認知機能障害疾患の正答率の高いバイオマーカーの組み合わせを選定すること、を含む、正答率が高い複数の認知機能障害疾患検出用バイオマーカーの組み合わせ選定方法を提供することができる。

このとき、ロジスティック回帰分析を用い、NDCとMCIを比して、MCIと区別する正答率が、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上であるとき、又は、NDCとADを比較して、ADと区別する正答率が、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上であるとき、MCI又はADであると区別しこれらを検出するためのバイオマーカーとして選択するのが好適である。

[0046] また、前記（i）の前に、被験者の生体試料中の認知機能障害疾患に関するタンパク質又はその部分ペプチドを、ROC曲線による分析に基づき、AUCが高いものを認知機能障害疾患検出用のバイオマーカーとして選定することができる。AUCが0.6以上となるタンパク質又はその部分ペプチドを、認知機能障害疾患検出用のバイオマーカーとするのが、有益である。

なお、ROC曲線及びロジスティック回帰曲線は、後記実施例に記載のとおりである。

[0047] これにより、最適なバイオマーカーの組み合わせを選出することができ、そのことで認知機能障害疾患の検出又は診断等の正答率が高くなる。よって、選定された複数のバイオマーカーを測定することで、より客観的により精

度よく認知機能障害疾患を検出、診断等することが可能となる。

この組み合わせのうち、前記（ｂ）バイオマーカー及び前記前記（ｃ）バイオマーカーを同時又は別々に測定し、これら測定結果に基づき認知機能障害疾患の検出、診断等に用い得るのが、最も正答率が高いので、好適である。

[0048] 本技術の方法は、CPU等を含む制御部及び記憶媒体（USBメモリ、HDD、CD、DVD等）を備えるハードウエア資源にプログラムとして格納し、検査装置や選定装置等の制御部によって、実行されることが可能である。

[0049] 本技術は、前記（ａ）～（ｃ）記載のバイオマーカーを用いる認知機能障害疾患の検出キットとしても利用することができる。

本技術は、前記（ａ）バイオマーカー（ApoA1）、前記（ｂ）バイオマーカー（TTR）及び（ｃ）バイオマーカー（C3）から選択される１種又は２種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを測定するための認知機能障害疾患の検出キットとすることができる。

このうち、（ｃ）バイオマーカー（C3）と、前記（ａ）バイオマーカー（ApoA1）又は（ｂ）バイオマーカー（TTR）とを組み合わせた検出キットが好適である。

また、本技術の検出キットは、これらを同時に又は別々に検出できるように、前記（ａ）～（ｃ）記載のバイオマーカー検出可能な試薬全てを一緒に含む一液型の認知機能障害用検出キットとしてもよし、又は、各バイオマーカーを検出可能な試薬を別々の容器に存在させた複数（２又は３以上の）の検出キッドを有する認知機能障害疾患用検出キットとしてもよい。

また、この検出キットには、本技術の各バイオマーカーに対する抗体又はアプタマーを含むのが好適である。

[0050] 本技術の認知機能障害疾患の検出方法として、生体試料中の、前記（ａ）バイオマーカー、前記（ｂ）バイオマーカー及び前記（ｃ）バイオマーカーから選択される１種又は２種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを同時又は別々に測定するのが好適である。

本技術の認知機能障害疾患の検出方法として、（i）被験者の生体試料中の前記（ａ）バイオマーカー、前記（ｂ）バイオマーカー及び前記（ｃ）バイオマーカーから選択される２種又は３種の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを同時又は別々に測定すること、(ii)少なくとも２種以上のバイオマーカーの測定結果が認知機能障害疾患に分類される場合、被験者を認知機能障害疾患と判定することを含むのが、より好適である。

[0051] 本技術は、以下の構成を採用することもできる。

すなわち、本技術は、以下のとおりである。

［１］ 次の（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）から選択される１種又は２種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むApolipoprotein A1のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｂ）配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretinのインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｃ）配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むComplement C3のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

[0052] ［２］ 生体試料中の、次の（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）から選択される１種又は２種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを同時又は別々に測定する認知機能障害疾患の検出方法。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むApolipoprotein A1のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｂ）配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretinのインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｃ）配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むComplement C3のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

［３］　以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を含む、請求項２記載の認知機能障害疾患の検出方法。

（ｉ）被験者の生体試料中の次の（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）から選択される２種又は３種の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを同時又は別々に測定すること。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むApolipoprotein A1のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｂ）配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretinのインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｃ）配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むComplement C3のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

(ii)少なくとも２種以上のバイオマーカーの測定結果が認知機能障害疾患に分類される場合、被験者を認知機能障害疾患と判定すること。

[0053] ［４］　前記（ｃ）バイオマーカーと、前記（ａ）バイオマーカー又は前記（ｂ）バイオマーカーとの２種を測定する前記［２］又は［３］記載の認知機能障害疾患の検出方法。

［５］　前記認知機能障害疾患の検出が、軽度認知障害の検出である場合、前記（ｃ）バイオマーカー及び前記（ａ）バイオマーカーの２種を測定する前記［２］～［４］の何れか１項記載の認知機能障害疾患の検出方法。

［６］　前記認知機能障害疾患の検出が、アルツハイマー病の検出である場合、前記（ｃ）バイオマーカー及び前記（ｂ）バイオマーカーの２種を測定する前記［２］～［４］の何れか１項記載の認知機能障害疾患の検出方法。

[0054] ［７］イムノ・ブロット法；ウェスタン・ブロット法；酵素若しくは蛍光若しくは放射性物質の標識法；質量分析法；immunoMS法；表面プラズモン共鳴法の何れか１つ以上の方法により測定する、前記［２］～［６］の何れか１項記載の認知機能障害疾患の検出方法。

[0055] ［８］　次の（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）から選択される１種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを測定するための認知機能障害疾患の検出キット。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むApolipoprotein A1のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｂ）配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretinのインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｃ）配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むComplement C3のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

[0056] ［９］　前記バイオマーカーに対する抗体又はアプタマーを含む前記［８］記載の認知機能障害疾患の検出キット。

［１０］前記抗体又はアプタマーが基板上に固相化されている前記［８］又は［９］記載の認知機能障害疾患の検出キット。

［１１］　前記（ｃ）バイオマーカーと、前記（ａ）バイオマーカー又は前記（ｂ）バイオマーカーとの２種を有する前記［８］～［１０］の何れか１項記載の認知機能障害疾患の検出キット。

［１２］　前記認知機能障害疾患の検出が、軽度認知障害の検出である場合、前記（ｃ）バイオマーカー及び前記（ａ）バイオマーカーの２種を有する前記［８］～［１１］の何れか１項記載の認知機能障害疾患の検出キット。

［１３］　前記認知機能障害疾患の検出が、アルツハイマー病の検出である場合、前記（ｃ）バイオマーカー及び前記（ｂ）バイオマーカーの２種を有

する前記［８］～［１１］の何れか１項記載の認知機能障害疾患の検出キット。

前記選出キットは、一液型でも、多液型でもよい。

[0057] ［１４］前記［２］～［７］の何れか１項記載の認知機能障害疾患の検出方法を行うための認知機能障害疾患の検出キット。

［１５］　前記［８］～［１３］の何れか１項記載の認知機能障害疾患の検出キットを用いる前記［２］～［７］の何れか１項記載の認知機能障害疾患の検出方法。

[0058] ［１６］　被験者の生体試料中の認知機能障害疾患の２種以上のバイオマーカーをそれぞれ測定すること；前記２種以上のバイオマーカーのそれぞれの測定結果をロジスティック回帰分析で解析すること；前記解析結果に基づき認知機能障害疾患の正答率の高いバイオマーカーの組み合わせを選定することを含む、正答率が高い複数の認知機能障害疾患検出用バイオマーカーの組み合わせ選定方法。

［１７］　マルチプレックスイムノアッセイ法で２種以上のタンパク質の測定を行うこと、

そのうち、MCI（軽度認知機能障害）対NDC（非認知機能障害）、AD（アルツハイマー病）対NDC（非認知機能障害）の比較におけるROC曲線を作成し、AUCが0.6以上を示すタンパク質を認知機能障害疾患バイオマーカーと選定することを含む、前記［１６］記載の認知機能障害疾患のバイオマーカーの組み合わせ選定方法。

［１８］　NDCとMCIを比してMCIと区別する正答率が、80%以上、より好ましくは85%以上である、及び／又は、NDCとADを比してADと区別する正答率が、85%%以上、より好ましくは90%以上である、前記［１６］又は［１７］記載の認知機能障害疾患のバイオマーカーの組み合わせ選定方法。

［１９］コンピュータを、前記［１６］～［１８］の何れか１項記載の方法を実行させるための認知機能障害疾患のバイオマーカーの組み合わせ選定プログラム又は当該プログラムを格納する制御部若しくはコンピュータ。

［２０］コンピュータを、前記［１６］～［１８］の何れか１項記載の方法を実行させるために記憶媒体上に記憶された認知機能障害疾患のバイオマーカーの組み合わせ選定プログラム又は当該プログラムを格納する制御部若しくはコンピュータ。

[0059] ［２１］　前記バイオマーカーが、配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、及び配列番号３で表されるアミノ酸配列からなるペプチドから選ばれる１種以上である前記［１］～［１８］の何れか１つの、バイオマーカー、検出方法、検出キット又は組み合わせ選定方法。

［２２］　前記部分ペプチドが、インタクトなタンパク質の部分ペプチド、又は当該タンパク質若しくはペプチドから生じるアミノ酸残基５個以上のペプチド断片である前記［１］～［１８］の何れか１つの、バイオマーカー、検出方法、検出キット又は組み合わせ選定方法。

[0060] 以下に、具体的な実施例等を説明するが、本発明（本技術）はこれに限定されるものではない。

実施例

[0061] 試験例１

＜マルチプレックスイムノアッセイ法による認知機能障害疾患マーカーの検出＞

アルツハイマー病を含む神経変性疾患に関わるマーカータンパク質のうち、補体系のComplement C3, Complement C4, Complement factor H、脳アミロイドーシスの原因であるAβ線維形成の抑制に関わるTransthyretin、Alpha-2-macroglobulinをマーカーとし、被験者から採取した生体試料をイムノアッセイ法に供してマーカーの有無ないし量を指標に認知機能障害疾患を検出する。

検出方法として、生体試料から複数のマーカー(アナライト)を同時に検出するマルチプレックスイムノアッセイ法を用いた。

[0062] （１）血清試料

以下、括弧の前は略称である。

AD(アルツハイマー病)37例、NDC(精神疾患に罹患していない被験者)22例、およびMCI(軽度認知機能障害)39例から得られた血清を用いた。

（２）方法

Apolipoprotein E (ApoE), Apolipoprotein A1 (ApoA1), Complement C3 (C3), Transthyretin (TTR), Complement Factor H (Factor H), Alpha-2-macroglobulin (Alpha-2-M)はMILLIPLEX™マルチプレックスキット(HNDG1-36K, Merck Millipore社)を用いて測定した。Complement C4 (C4)はMILLIPLEX™マルチプレックスキット(HNDG2-36K, Merck Millipore社)を用いて測定した。

[0063] （２－１）血清サンプルの調製

(ApoE, ApoA1, C3, TTR, Factor H, Alpha-2-M測定用血清サンプル)

血清サンプルを40,000倍希釈したものを用いた。すなわち、血清5 μlを1.5 mlチューブに加え、Assay Bufferを995 μl加えて穏やかに攪拌した。この希釈液5 μlを別のチューブに取り、Assay Bufferを995 μl加えて穏やかに攪拌した。これをアッセイサンプルとした。

(C4測定用血清サンプル)

血清サンプルを2,000倍希釈したものを用いた。すなわち、血清5 μlを1.5 mlチューブに加え、Assay Bufferを495 μl加えて穏やかに攪拌した。この希釈液10 μlを別のチューブに取り、Assay Bufferを190 μl加えて穏やかに攪拌した。これをアッセイサンプルとした。

（２－２）ビーズ希釈液の調製

検出対象のタンパク質を認識する抗体が結合したビーズを混合・希釈して、ビーズ希釈液を調製した。

(ApoE, ApoA1, C3, TTR, Factor H, Alpha-2-M測定用ビーズ希釈液)

ミキシング用ボトルにBead Diluentを2,100 μl加え、さらに各抗体が結合したビーズ懸濁液6種類をそれぞれ150 μl加えて攪拌した。これをビーズ希釈液とした。

(C4測定用ビーズ希釈液)

ミキシング用ボトルにBead Diluentを2,850 μl加え、C4抗体が結合したビーズ懸濁液を150 μl加えて攪拌した。これをビーズ希釈液とした。

[0064] （２－３）QCサンプルの調製

Quality Control用タンパク質が封入されているボトルに純水を 250 μl加え、穏やかに攪拌したのち、5～10分間静置した。これをQCサンプルとした。

（２－４）スタンダードサンプルの調製

定量用標準曲線作成用のスタンダードサンプルは6段階の段階希釈で作成した。すなわち、スタンダードタンパク質が入っているボトルに250 μlの純水を加えて穏やかに攪拌したのち、5～10分間静置し、これを最高濃度のスタンダード溶液とした。これを50 μlを別のチューブに取り、Assay Buffer 150 μlを加えて攪拌した。さらに、希釈した溶液50 μlを別のチューブに取り、Assay Buffer 150 μlを加えて攪拌した。これを合計6回繰り返した。希釈の系列は1, 4, 16, 64, 256, 1024, 4096倍である。

[0065] （２－５）抗原抗体反応

ApoE, ApoA1, C3, TTR, Factor H, Alpha-2-Mを測定するアッセイ用96Wellフィルタープレートと、C4を測定するアッセイ用96Wellフィルタープレートを別々に用意して抗原抗体反応を行った。

アッセイ用96Wellフィルタープレートに200 μlのWash Buffer を加えて、Plate Shaker (M・BR-022, TAITEC社)を用いて1,200 rpmで10分間、室温で攪拌した。その後、マニホールドを用いて、Wash Bufferを吸引除去した。使用ずる全WellにAssay Bufferを25 μlを加え、さらにビーズ希釈液を25 μl加えた。続いて、アッセイサンプル用Well、スタンダードサンプル用Well、QCサンプル用Well、バックグラウンド測定用Wellにそれぞれのサンプルを25 μlを加えた。バックグラウンド測定用WellにはAssay Bufferを加えた。プレートをシーリングしたのち、Plate Shakerで抗原抗体反応を行った。ApoE, ApoA1, C3, TTR, Factor H, Alpha-2-M測定用プレートは2時間、室温で抗原抗体反応を行った。C4測定用プレートは16時間、4℃で抗原抗体反応を行った。

[0066] （２－６）洗浄および測定

抗原抗体反応後、溶液を吸引除去し、さらにWash Buffer を200 μl加えて吸引除去を3回繰り返し、ビーズの洗浄を行った。洗浄後、Detection Antibodiesを25 μlを使用Well全てに25 μl加えてプレートをシーリングし、Plate Shakerで1時間、室温で攪拌して二次抗体反応を行った。反応後、Streptavidin-Phycoerythrinを25 μl加えてシーリングし、Plate Shakerで30分間、室温で攪拌した。反応後、溶液を吸引除去し、さらにWash Buffer を200 μl加えて吸引除去を3回繰り返し、ビーズの洗浄を行った。100 μlのSheath Fluidを各Wellに加えて5分間室温で攪拌したのち、Luminex 200™(Luminex Corp., USA)で蛍光測定を行った。血清サンプル中のマーカーの定量解析は、xPONENT 3.1 ソフトウェア(Luminex Corp., USA)を用いて、スタンダードサンプルから求められた標準曲線の数式を用いて定量した。

[0067] （３）結果

検出したマーカータンパク質がNDC群、MCI群、AD群で血清中の存在量に差があるか差異解析を行った。表１は各症例群を２対t検定で検定し、有意水準を$p<0.05$とした時のp値を示した表である。Complement C3 (C3)はNDC対MCI、NDC対AD、MCI対ADのいずれでも有意に差がみられ、認知機能障害疾患(MCI、AD)患者を非認知機能障害(NDC)患者と区別するのに有用であることが分かった。また、Apolipoprotein A1 (ApoA1)、Transthyretin (TTR)はAD患者をNDCと区別するのに有用であることが分かった。Apolipoprotein E (ApoE)、Complement factor H (Factor H)、Alpha-2-macroglobulin (Alpha-2-M)、Complement C4 (C4)はいずれの疾患群とも有意な差を示さなかった。

検出したマーカータンパク質がどの程度に有用であるかを評価するために、受信者操作特性曲線(receiver operating characteristic curve, ROC曲線)による分析を行った。ROC曲線の下部の面積値(AUC of ROC)(以下、AUCという)が1に近いほどバイオマーカーとしての有用性が高くなる。MCI対NDC、AD対NDCの比較におけるROC曲線を作成し、AUCが0.6以上を示すマーカータンパク質を解析したところ、C3、ApoA1、TTRがAUCが0.6以上を示すマーカーであった。表２にC3、ApoA1、TTRのNDC対MCI、NDC対ADのAUCを示した。

図１、図２、図３はC3、ApoA1、TTRの３つのマーカータンパク質について、差異解析とROC曲線を示している。図１のＡ）は差異解析の図であり、NDCとMCIで比較するとMCIでC3は有意に減少し(t検定、p値0.034)、NDCとADで比較するとADでC3は有意に減少している(t検定、p値1.668E-4)。さらに、MCIとADで比較するとADでC3は有意に減少している(t検定、p値0.01)。図１のＢ）および、Ｃ）はNDC対MCI、NDC対ADで比較した時のROC曲線である。NDCとMCIで比較した時のAUCは0.663、NDCとADで比較した時のAUCは0.834であった。図２のＡ）はApoA1の差異解析の図であり、NDCとADで比較するとADでC3は有意に減少している(t検定、p値0.049)。図２のＢ）および、Ｃ）はNDC対MCI、NDC対ADで比較した時のROC曲線である。NDCとMCIで比較した時のAUCは0.649、NDCとADで比較した時のAUCは0.673であった。図３のＡ）はTTRの差異解析の図であり、NDCとADで比較するとADでC3は有意に減少している(t検定、p値5.811E-4)。図３のＢ）および、Ｃ）はNDC対MCI、NDC対ADで比較した時のROC曲線である。NDCとMCIで比較した時のAUCは0.677、NDCとADで比較した時のAUCは0.730であった。

これら、C3、ApoA1、TTRの3つのマーカータンパク質について、NDCに対して、MCI、ADをより精度よく区別する組み合わせを解析するため、試験例２を行った。

[0068] [表1]

	p value at t-test						
	C3	**ApoA1**	**TTR**	ApoE	Factor H	Alpha-2-M	C4
NDC vs. MCI	0.034	0.069	0.086	0.905	0.141	0.683	0.141
NDC vs. AD	**1.668E-05**	**0.049**	**5.811E-04**	0.214	0.982	0.476	0.111
MCI vs. AD	0.010	0.902	0.265	0.206	0.153	0.231	0.883

[0069]

[表2]

Marker	AUC of ROC	
	NDC vs. MCI	NDC vs. AD
C3	0.663	0.834
ApoA1	0.649	0.673
TTR	0.667	0.73

[0070] [1] Apolipoprotein A1由来のペプチド（ApoA1）（配列番号１）

〔インタクトタンパク質／ペプチド〕

0001 MKAAVLTLAV LFLTGSQARH FWQQDEPPQS PWDRVKDLAT VYVDVLKDSG

0051 RDYVSQFEGS ALGKQLNLKL LDNWDSVTST FSKLREQLGP VTQEFWDNLE

0101 KETEGLRQEM SKDLEEVKAK VQPYLDDFQK KWQEEMELYR QKVEPLRAEL

0151 QEGARQKLHE LQEKLSPLGE EMRDRARAHV DALRTHLAPY SDELRQRLAA

0201 RLEALKENGG ARLAEYHAKA TEHLSTLSEK AKPALEDLRQ GLLPVLESFK

0251 VSFLSALEEY TKKLNTQ

[0071] [2] Transthyretin由来ペプチド（TTR）（配列番号２）

〔インタクトタンパク質／ペプチド〕

0001 MASHRLLLLC LAGLVFVSEA GPTGTGESKC PLMVKVLDAV RGSPAINVAV

0051 HVFRKAADDT WEPFASGKTS ESGELHGLTT EEEFVEGIYK VEIDTKSYWK

0101 ALGISPFHEH AEVVFTANDS GPRRYTIAAL LSPYSYSTTA VVTNPKE

[0072] [3] Complement C3由来ペプチド（C3）（配列番号３）

〔インタクトタンパク質／ペプチド〕

0001 MGPTSGPSLL LLLLTHLPLA LGSPMYSIIT PNILRLESEE TMVLEAHDAQ

0051 GDVPVTVTVH DFPGKKLVLS SEKTVLTPAT NHMGNVTFTI PANREFKSEK

0101 GRNKFVTVQA TFGTQVVEKV VLVSLQSGYL FIQTDKTIYT PGSTVLYRIF

0151 TVNHKLLPVG RTVMVNIENP EGIPVKQDSL SSQNQLGVLP LSWDIPELVN

0201 MGQWKIRAYY ENSPQQVFST EFEVKEYVLP SFEVIVEPTE KFYYIYNEKG

0251 LEVTITARFL YGKKVEGTAF VIFGIQDGEQ RISLPESLKR IPIEDGSGEV

0301 VLSRKVLLDG VQNPRAEDLV GKSLYVSATV ILHSGSDMVQ AERSGIPIVT

0351 SPYQIHFTKT PKYFKPGMPF DLMVFVTNPD GSPAYRVPVA VQGEDTVQSL

0401 TQGDGVAKLS INTHPSQKPL SITVRTKKQE LSEAEQATRT MQALPYSTVG

0451 NSNNYLHLSV LRTELRPGET LNVNFLLRMD RAHEAKIRYY TYLIMNKGRL

0501 LKAGRQVREP GQDLVVLPLS ITTDFIPSFR LVAYYTLIGA SGQREVVADS

0551 VWVDVKDSCV GSLVVKSGQS EDRQPVPGQQ MTLKIEGDHG ARVVLVAVDK

0601 GVFVLNKKNK LTQSKIWDVV EKADIGCTPG SGKDYAGVFS DAGLTFTSSS

0651 GQQTAQRAEL QCPQPAARRR RSVQLTEKRM DKVGKYPKEL RKCCEDGMRE

0701 NPMRFSCQRR TRFISLGEAC KKVFLDCCNY ITELRRQHAR ASHLGLARSN

0751 LDEDIIAEEN IVSRSEFPES WLWNVEDLKE PPKNGISTKL MNIFLKDSIT

0801 TWEILAVSMS DKKGICVADP FEVTVMQDFF IDLRLPYSVV RNEQVEIRAV

0851 LYNYRQNQEL KVRVELLHNP AFCSLATTKR RHQQTVTIPP KSSLSVPYVI

0901 VPLKTGLQEV EVKAAVYHHF ISDGVRKSLK VVPEGIRMNK TVAVRTLDPE

0951 RLGREGVQKE DIPPADLSDQ VPDTESETRI LLQGTPVAQM TEDAVDAERL

1001 KHLIVTPSGC GEQNMIGMTP TVIAVHYLDE TEQWEKFGLE KRQGALELIK

1051 KGYTQQLAFR QPSSAFAAFV KRAPSTWLTA YVVKVFSLAV NLIAIDSQVL

1101 CGAVKWLILE KQKPDGVFQE DAPVIHQEMI GGLRNNNEKD MALTAFVLIS

1151 LQEAKDICEE QVNSLPGSIT KAGDFLEANY MNLQRSYTVA IAGYALAQMG

1201 RLKGPLLNKF LTTAKDKNRW EDPGKQLYNV EATSYALLAL LQLKDFDFVP

1251 PVVRWLNEQR YYGGGYGSTQ ATFMVFQALA QYQKDAPDHQ ELNLDVSLQL

1301 PSRSSKITHR IHWESASLLR SEETKENEGF TVTAEGKGQG TLSVVTMYHA

1351 KAKDQLTCNK FDLKVTIKPA PETEKRPQDA KNTMILEICT RYRGDQDATM

1401 SILDISMMTG FAPDTDDLKQ LANGVDRYIS KYELDKAFSD RNTLIIYLDK

1451 VSHSEDDCLA FKVHQYFNVE LIQPGAVKVY AYYNLEESCT RFYHPEKEDG

1501 KLNKLCRDEL CRCAEENCFI QKSDDKVTLE ERLDKACEPG VDYVYKTRLV

1551 KVQLSNDFDE YIMAIEQTIK SGSDEVQVGQ QRTFISPIKC REALKLEEKK

1601 HYLMWGLSSD FWGEKPNLSY IIGKDTWVEH WPEEDECQDE ENQKQCQDLG

1651 AFTESMVVFG CPN

[0073] 試験例２

＜ロジスティック回帰分析を用いたマルチマーカーによるMCI、ADの区別＞

（１）ロジスティック回帰分析の原理

この方法はバイオマーカーに対応する各パラメーターの係数をデータセットから得て、二つの疾患カテゴリー(正常、疾患)における患者ごとの判定確率を与えることができる。ロジスティック回帰に関する比較的丁寧な解説は以下から得られる（非特許文献３：Czepiel, SA, http://czep.net/stat/mlelr.pdf, 2010, Maximum likelihood estimation of logistic regression models: theory and implementation.）。この解説にはNewton-Raphson法による分析法が含まれている。

この解析手法の原理は以下のとおりである。ある事象の生起確率をPとしたとき、

式１

[0074]
$$F(Z) = p = \frac{1}{1+e^{-Z}} \qquad (1)$$

[0075] は累積標準正規分布に近似できることが知られている（非特許文献４：Bowling, SR, et al. JIEM, 2009, 2: 114-127, A logistic approximation to the cumulative normal distribution.）。ロジスティック回帰はこの近似を利用して統計解析を行う。以下のようにZは多変量x_i;i=1,2,…rの線形結合として表わされる。

式２

[0076]
$$Z = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \cdots + \beta_r x_r \qquad (2)$$

[0077] 多数のデータを式(1)および(2)に当てはめて、係数（coefficient）β_iを求め、その有意性（β_iがゼロではないこと）を統計学的p値から判定する。

式(2)の最終化法として以下の2通りがある。

（I）係数の統計的有意性による方法

有意でない係数が見出された場合は、これを除外して式(2)を作り、同様に当てはめを行うことを繰り返す。こうして、式(2)の係数がすべて有意になったら、x_iの実測値を代入して(2)からZ値を求める。ついで式(1)からP（判定確率）の値を求めることができる。なお、係数β_iについてはその標準誤差（standard error）を算出することができる。

[0078] （II）最大正答率を与える係数の組み合わせを求める方法

正答率とは元来属する群に属すると正しく判定された率をいうが、この方法では、統計的有意性が認められない係数を含むすべての係数を対象にtrial and errorにより最大正答率を与える係数の組み合わせを求める。判定確率は（I）と同様に求める。

ロジスティック回帰の正答率を以下の式(3)によって定義する。判別は被験者の二つのカテゴリー（例えばNDCとMCI）のうちのどちらに属するかをロジスティック回帰式から推定することによって行われる。被験者のカテゴリーをi（例えばMCI）とし、ロジスティック回帰式から得られた判定確率が0.5以上のときiと正しく診断されたとみなす。カテゴリーiの総被験者数をN_i、正しくiと診断された被験者数をC_iとして、

式３

[0079]

$$\text{正答率} = C_i / N_i \qquad (3)$$

[0080] と正答率が表わされる。

ロジスティック回帰において変量x_iに対するオッズ比（odds ratio）とはx_iを1単位増加させた場合のオッズを元のオッズで割った値であるが、これは$\exp(\beta_i)$に等しい。オッズ比が1であるとは、x_iを1単位増加させても元と同じオッズであるので、今考えている事象の起きる確率に変化がないことを意味する。すなわち、この場合β_iは0であり、Zに寄与していないことを示す。オッズ比の95%信頼区間が1を含む場合も統計学的にそのβ_iは有意ではないことになる。なお、当然ながら$\exp(0) = 1$である。

[0081] （２）ロジスティック回帰分析

試験例１において、マルチプレックスイムノアッセイ法で測定したタンパク質Apolipoprotein E (ApoE)、Apolipoprotein A1 (ApoA1)、Complement C3 (C3)、Transthyretin (TTR)、Complement Factor H (Factor H)、Alpha-2-macroglobulin (Alpha-2-M)、Complement C4 (C4)のうち、NDC対MCI、NDC対ADの２群有意差検定(t検定)で有意に差がみられ、さらにROC曲線のAUCが0.6以上を示した3つのタンパク質C3、ApoA1、TTRを選択し、ロジスティック回帰分析を行った。ロジスティック回帰分析による解析はtrial and errorによってマーカータンパク質の加除を行い、正答率が最も高い結果を得るマーカータンパク質の組み合わせを求め、この組み合わせによるロジスティック回帰式（2）の係数（coefficient, β_i）を算出した。

ロジスティック回帰分析はMedCalc for Windows（登録商標）, version 9, 2007, （MedCalc Software社）を用いて実行した。このプログラムはNewton-Raphson法によっている。

[0082] （３）結果：MCIであると区別し、正答率が最も高い結果を得るマーカータンパク質の組み合わせとロジスティック回帰式の係数

マーカータンパク質3種の組み合わせとその組み合わせのデータを用いてロジスティック回帰を行い、算出された統計学的p値の表を表３に示す。組み合わせに用いたマーカータンパク質は（○）で示し、使用しなかったものは（-）で示した。

[0083] [表3]

No.	ApoA1	TTR	C3	p value
1	**-**	**-**	**○**	**p<0.05**
2	-	○	-	TTR (p>0.05)
3	**-**	**○**	**○**	**p<0.05**
4	○	-	-	ApoA1 (p>0.05)
5	**○**	**-**	**○**	**p<0.05**
6	○	○	-	ApoA1 TTR (p>0.05)
7	○	○	○	ApoA1 TTR (p>0.05)

[0084] 統計学的p値がp>0.05の場合、ロジスティック回帰式の係数は有意性は認められない。そこで、表３のNo. 2、4、6、7は係数算出から除外した。表３のNo. 1、3、5の組み合わせの内、最も正答率が高い結果を得るマーカータンパク質の組み合わせとロジスティック回帰式の係数(Coefficient)を表５に示した。最も正答率が高い結果を得る組み合わせのマーカータンパク質はComplement C3 (C3)とApolipoprotein A1 (ApoA1)であり、この時のロジスティック回帰式の係数は、C3が-0.02567、ApoA1が-0.001653、定数が4.6667であった。NDCとMCIを比してMCIと区別する正答率は89.74%であり、NDCの正答率は50%であった。

[0085] （４）結果：ADであると区別し、正答率が最も高い結果を得るマーカータンパク質の組み合わせとロジスティック回帰式の係数

マーカータンパク質3種の組み合わせとその組み合わせのデータを用いてロジスティック回帰を行い、算出された統計学的p値の表を表４に示す。組み合わせに用いたマーカータンパク質は（○）で示し、使用しなかったものは（-）で示した。

[0086] [表4]

No.	ApoA1	TTR	C3	p value
1	-	-	○	**p<0.05**
2	-	○	-	**p<0.05**
3	-	○	○	**p<0.05**
4	○	-	-	ApoA1 (p>0.05)
5	○	-	○	ApoA1 (p>0.05)
6	○	○	-	ApoA1 (p>0.05)
7	○	○	○	ApoA1 (p>0.05)

[0087] 統計学的p値がp>0.05の場合、ロジスティック回帰式の係数は有意ではない。そのため、表４のNo. 4、5、6、7は係数算出から除外した。表４のNo. 1、2、3の組み合わせの内、最も正答率が高い結果を得るマーカータンパク質の

組み合わせとロジスティック回帰式の係数(Coefficient)を表６に示した。最も正答率が高い結果を得る組み合わせのマーカータンパク質はComplement C3 (C3)とTransthyretin (TTR)であり、この時のロジスティック回帰式の係数は、C3が-0.0465、TTRが-0.00564、定数が4.5218であった。NDCとADを比してADと区別する正答率は91.89%であり、NDCの正答率は68.18%であった。

[0088] [表5]

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std. Error	p value
ApoA1	**-0.001653**	0.0007481	0.02713
C3	**-0.02567**	0.01077	0.01713
Constant	**4.6667**		

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds Ratio	95% CI
ApoA1	0.9983	0.9969 to 0.9998
C3	0.9747	0.9543 to 0.9954

Classification table

Actual group	Predicted group		Percent correct
	NDC	**MCI**	
NDC (n=22)	**11**	11	50.00%
MCI (n=39)	4	**35**	**89.74%**
Percent of cases correctly classified			75.41%

[0089]

[表6]

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std. Error	P value
TTR	**-0.00564**	0.002451	0.02139
C3	**-0.0465**	0.01615	0.003979
Constant	**4.5218**		

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds Ratio	95% CI
TTR	0.9944	0.9896 to 0.9992
C3	0.9546	0.9248 to 0.9853

Classification table

Actual group	Predicted group		Percent correct
	NDC	**AD**	
NDC (n=22)	**15**	7	68.18%
AD (n=37)	3	**34**	**91.89%**
Percent of cases correctly classified			83.05%

産業上の利用可能性

[0090] 本開示のバイオマーカーを複数用いれば、軽度認知機能障害及びアルツハイマー病を含む認知機能障害疾患の検出の精度が高くなり、診断薬を含む診断分野における用途に適用できる。

請求の範囲

[請求項1] 次の（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）から選択される１種又は２種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むApolipoprotein A 1のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｂ）配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretinのインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｃ）配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むComplement C3のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

[請求項2] 生体試料中の、次の（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）から選択される１種又は２種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを同時又は別々に測定する認知機能障害疾患の検出方法。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むApolipoprotein A 1のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｂ）配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretinのインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｃ）配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むComplement C3のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

[請求項3] 前記（ｃ）バイオマーカーと、前記（ａ）バイオマーカー又は前記（ｂ）バイオマーカーとの２種を測定する請求項２記載の認知機能障害疾患の検出方法。

[請求項4] 前記認知機能障害疾患の検出が軽度認知障害の検出である場合、前

記（ｃ）バイオマーカー及び前記（ａ）バイオマーカーの２種を測定するか、又は

前記認知機能障害疾患の検出がアルツハイマー病の検出である場合、前記（ｃ）バイオマーカー及び前記（ｂ）バイオマーカーの２種を測定する、請求項２又は３記載の認知機能障害疾患の検出方法。

[請求項5] 次の（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）から選択される１種又は２種以上の認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカーを測定するための認知機能障害疾患の検出キット。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むApolipoprotein A 1のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｂ）配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むTransthyretinのインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

（ｃ）配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むComplement C3のインタクトなタンパク質又はこの部分ペプチドからなる認知機能障害疾患を検出するためのバイオマーカー

[請求項6] 前記バイオマーカーに対する抗体又はアプタマーを含む請求項５記載の認知機能障害疾患の検出キット。

[請求項7] 被験者の生体試料中の認知機能障害疾患の２種以上のバイオマーカーをそれぞれ測定すること、

前記２種以上のバイオマーカーのそれぞれの測定結果をロジスティック回帰分析で解析すること、

前記解析結果に基づき認知機能障害疾患の正答率の高いバイオマーカーの組み合わせを選定すること、

を含む、正答率が高い複数の認知機能障害疾患検出用バイオマーカーの組み合わせ選定方法。