

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年1月15日 (15.01.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/008511 A1

- (51) 国際特許分類:
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/062616
- (22) 国際出願日: 2008年7月11日 (11.07.2008)
- (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2007-183306 2007年7月12日 (12.07.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 信州大学 (SHINSHU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本市旭3丁目1番1号 Nagano (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 林 琢磨 (HAYASHI, Takuma) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本市旭3-1-1 国立大学法人信州大学医学部内 Nagano (JP). 高橋 康子 (TAKAHASHI, Yasuko) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本市旭3-1-1 国立大学法人信州大学医学部内 Nagano (JP). 柳平 朋子 (YANAGIDAIRA, Tomoko) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本市旭3-1-1 国立大学法人信州大学医学部内 Nagano (JP). 谷口 俊一郎 (TANIGUCHI, Shunichiro) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本市旭3-1-1 国立大学法人信州大学医学部内 Nagano (JP). 村田 敏規 (MURATA, Toshinori) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本市旭3-1-1 国立大学法人信州大学医学部内 Nagano (JP).
- (74) 代理人: 小宮 良雄, 外(KOMIYA, Yoshio et al.); 〒1020074 東京都千代田区九段南3丁目7番14号 千代田Kビル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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: NORMAL-PRESSURE GLAUCOMA MODEL AND METHOD OF EVALUATING TEST SUBSTANCE BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: 正常眼圧緑内障モデル及びそれを用いた被験物質の評価方法

(57) Abstract: It is intended to provide a simple normal-pressure glaucoma model capable of spontaneously, month age-dependently and surely developing conditions similar to the symptom of normal-pressure glaucoma which occurs more frequently in elder patients and a method of evaluating a therapeutic effect on normal-pressure glaucoma whereby a drug useful in treating and diagnosing can be conveniently screened by using the above-described model. A normal-pressure glaucoma model comprising a nonhuman mammal, which is deficient in a transcriptional regulator NF- κ Bp50 and thus spontaneously develops the normal-pressure glaucoma symptom month age-dependently, an organ or a tissue thereof or cells collected from any of the same. A method of evaluating a therapeutic effect on normal-pressure glaucoma of a test substance which comprises administering or adding the test substance to the above-described nonhuman mammal, an organ or a tissue thereof or cells collected from any of the same, and measuring a morphological defect, cell count, pressure, the expression amount or activity strength of a protein, the expression amount of a nucleic acid and/or the activity strength of an antibody in the organ, tissue and/or cells as indication(s) for the evaluation.

(57) 要約: 高齢者ほど発症し易い正常眼圧緑内障の症状に似た形態を自発的に、月齢依存的に、確実に発症する簡易な正常眼圧緑内障モデル、及びそれを用い治療・診断に有用な薬物を簡便にスクリーニングする正常眼圧緑内障治療効果評価方法を提供する。正常眼圧緑内障モデルは、転写調節因子NF- κ Bp50が欠損しそれにより月齢に応じて正常眼圧緑内障症状を自発的に発現する非ヒト哺乳動物、その器官若しくは組織、又はそれらの何れかから採取した細胞である。被験物質の正常眼圧緑内障治療効果を評価する方法は、この非ヒト哺乳動物、その器官若しくは組織、又はそれらの何れかから採取した細胞へ、被験物質を投与又は添加し、該器官、該組織、及び/又は該細胞について、形態異常、細胞数、圧力、蛋白質の発現量若しくは活性強度、核酸の発現量、及び/又は抗体の活性強度を指標として測定して、評価するものである。

WO 2009/008511 A1

明 細 書

正常眼圧緑内障モデル及びそれを用いた被験物質の評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、中高年齢者に発症し易い正常眼圧緑内障の症状に似た形態を月齢依存的に示す正常眼圧緑内障モデル、及びそれを用いた正常眼圧緑内障治療効果評価方法、正常眼圧緑内障の治療剤、診断・リスク予測に関するものである。

背景技術

[0002] 失明のうちの主要な疾病の一つである緑内障は、老化や、ストレスのような悪い生活習慣の所為で、視神経が損傷し、視野に欠損が生じた疾病である。

[0003] 緑内障は、眼圧の上昇が主な病因であると考えられていた。眼の水晶体に入った光が網膜の光レセプターで捉えられることにより発せられる生体信号が、網膜の視神経を介し、その視神経が束ねられた眼球の後方の視神経乳頭部から、脳へ伝達される。高眼圧緑内障は、眼圧が高い所為で、次第にこの網膜の視神経が萎縮や膨潤して損傷し、網膜に存する一種の神経細胞である網膜視神経節細胞(RGC)がアポトーシスにより死滅し、その後、視神経乳頭部の陥没が惹き起こされ、だんだん視野が狭まり、終には視力を失ってしまうという疾病である。高眼圧緑内障の最近の研究から、虚血、グルタミン酸塩多量摂取、遺伝等が緑内障の発症や進行の危険因子であることや、網膜の蛋白質を直接認識する自己免疫が緑内障の進行に関与していることが、分かってきた。

[0004] しかし、病因は明らかでないが正常眼圧でも緑内障が、高い頻度で発症する。正常眼圧緑内障は、臨床的に、(1)眼圧が10~21mmHgという正常値範囲内、(2)視神経乳頭辺縁部狭細化および陥没、(3)網膜視神経線維層欠損、(4)篩板(篩骨眼窩板)部位での視神経変形・後方偏位、(5)視神経節細胞とグリア細胞の減少という5つのカテゴリーの全ての臨床所見が、総合的に認められるもので、特異的な視神経病変をきたす疾患であると、定義されている。

[0005] このような正常眼圧緑内障は、網膜視神経節細胞の萎縮・膨潤、アポトーシス及び視神経乳頭部の陥没という高眼圧緑内障と同様な過程を経て、視野欠損を伴いなが

ら、進行し、失明に至らせる。我が国の正常眼圧緑内障患者の割合は高く、人口の数%を占めると言われている。具体的には40歳以上の28人に1人(3.6%)が、正常眼圧緑内障である。しかも40歳を境にそれ以上の中高齢者で、加齢に伴い正常眼圧緑内障罹患率が、男女を問わず、顕著に増加している。正常眼圧緑内障罹患率は、40歳未満で0.1%程度であるが、40歳代で2%弱、50歳代で2%強、60歳代で約6%、70歳以上で約7%である。このような正常眼圧緑内障は、我が国では、糖尿病網膜症に次ぎ、第2位の失明原因となっている。この正常眼圧緑内障は、病因も発症機序も明らかでない。その所為で、現在のところ、正常眼圧緑内障の発症により一旦狭窄してしまった視野を回復する抜本的な治療法がない。そこで、交感神経遮断薬・交感神経刺激薬・副交感神経刺激薬・プロスタグランジン関連薬・炭酸脱水酵素阻害薬等の点眼薬を用い、眼圧を下げるという対処療法が行われている。

[0006] このような正常眼圧緑内障の発症メカニズムを解明したり、治療法・治療剤、予防法・予防剤を開発したりするのに、40歳を過ぎてから年齢依存的に、発症し易くなりまた症状が悪化し易くなるというヒトの慢性疾患特有の進行過程に似た適当な正常眼圧緑内障モデルが必要である。

[0007] 特許文献1には、アルミニウム化合物を投与して視神経軸索障害を惹起させた正常眼圧緑内障動物モデルが、開示されている。しかし、この動物モデルは、外部からの薬物投与で障害を強制的に惹起させるもので、自発的に発症するものではなく、ましてや月齢依存的な症状の悪化を示すものでもない。

[0008] 特許文献1:特開2004-313188号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は前記の課題を解決するためになされたもので、中高齢者ほど発症し易い正常眼圧緑内障の症状や臨床所見に似た形態を自発的に、月齢依存的に、確実に発症する簡易な正常眼圧緑内障モデル、それを用い治療・診断に有用な薬物を簡便にスクリーニングするための正常眼圧緑内障治療効果評価方法、及び安全で簡便な正常眼圧緑内障治療剤、簡易で確実な正常眼圧緑内障の診断やリスクの予測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

- [0010] 前記の目的を達成するためになされた特許請求の範囲の請求項1に記載の正常眼圧緑内障モデルは、転写調節因子NF- κ Bp50が欠損しそれにより月齢に応じて正常眼圧緑内障症状を自発的に発現する非ヒト哺乳動物、その器官若しくは組織、又はそれらの何れかから採取した細胞であることを特徴とする。
- [0011] 請求項2に記載の正常眼圧緑内障モデルは、請求項1に記載されたもので、該非ヒト哺乳動物がマウスであることを特徴とする。
- [0012] 請求項3に記載の評価方法は、転写調節因子NF- κ Bp50が欠損しそれにより月齢に応じて正常眼圧緑内障症状を自発的に発現する非ヒト哺乳動物、その器官若しくは組織、又はそれらの何れかから採取した細胞へ、被験物質を投与又は添加し、該器官、該組織、及び／又は該細胞について、形態異常、細胞数、圧力、蛋白質の発現量若しくは活性強度、核酸の発現量、及び／又は抗体の活性強度を指標として測定をして、該被験物質の正常眼圧緑内障治療効果を評価するというものである。
- [0013] 請求項4に記載の評価方法は、請求項3に記載されたもので、
該非ヒト哺乳動物を該被験物質の該投与の条件下及び非投与の条件下で夫々飼育し、又は該細胞を該被験物質の該添加の条件下及び非添加の条件下で夫々培養する第1工程、
該指標を観察、測定、又は検出することにより該測定をする第2工程、
該投与の条件下と該非投与の条件下との各々の該指標を比較し、又は該添加の条件下と該非添加の条件下との各々の該指標を比較することにより、該被験物質を該評価して峻別する第3工程
を有することを特徴とする。
- [0014] 請求項5に記載の評価方法は、請求項3に記載されたもので、該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする。
- [0015] 請求項6に記載の評価方法は、請求項3に記載されたもので、該器官又は該組織が、眼、網膜、視神経、網膜神経節細胞、網膜神経節層、網膜神経繊維層、網膜顆粒層、網膜網状層、視神経軸索、又は視神経乳頭であることを特徴とする。
- [0016] 請求項7に記載の評価方法は、請求項4に記載されたもので、該被験物質とは別に

、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)又はその塩を、投与又は添加することを特徴とする。

[0017] 請求項8に記載の評価方法は、請求項3に記載されたもので、該被験物質が、NMDA阻害剤、カルシウム拮抗剤、I κ B分解阻害剤、NF- κ Bデコイオリゴ核酸、及びカルシニューリン阻害剤の少なくとも何れかであることを特徴とする。

[0018] 請求項9に記載の評価方法は、非ヒト哺乳動物の個体、又は該非ヒト哺乳動物若しくはヒトの細胞に、被検物質を投与又は添加し、該個体中又は該細胞内での転写調節因子NF- κ Bp50の発現量又は活性強度を指標として測定をして、該被験物質の正常眼圧緑内障治療効果を評価するというものである。

[0019] 請求項10に記載の評価方法は、請求項9に記載されたもので、
該細胞を該被験物質の該添加の条件下及び非添加の条件下、培養液中で夫々培養する第1工程、
該細胞内又は該培養液中で、該転写調節因子NF- κ Bp50の発現量又は活性強度である該指標を該測定する第2工程、
該添加の条件下と該非添加の条件下との各々の該指標を比較して、該添加の条件下での該発現量の増加又は該活性強度の増強により、該被験物質を該評価して峻別する第3工程
を有することを特徴とする。

[0020] 請求項11に記載の評価方法は、請求項10に記載されたもので、該細胞が、転写調節因子NF- κ Bp50の欠損により月齢に応じて正常眼圧緑内障症状を自発的に発現する該非ヒト哺乳動物に由来して、若しくは緑内障患者である該ヒトに由来して、単離されたものであり、又はその細胞株であることを特徴とする。

[0021] 請求項12に記載の評価方法は、請求項9に記載されたもので、
該非ヒト哺乳動物を該被験物質の該投与の条件下及び非投与の条件下で夫々飼育する第1工程、
該非ヒト哺乳動物の血液中又は細胞内での該転写調節因子NF- κ Bp50の発現量又は活性強度である該指標を該測定する第2工程、
該投与の条件下と該非投与の条件下との各々の該指標を比較して、該投与の条

件下での該発現量の増加又は該活性強度の増強により、該被験物質を該評価して峻別する第3工程

を有することを特徴とする。

[0022] 請求項13に記載の評価方法は、請求項11に記載されたもので、該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする。

[0023] 請求項14に記載の正常眼圧緑内障治療剤は、転写調整因子NF- κ Bの転写誘導活性の抑制剤であることを特徴とする。転写調整因子NF- κ Bの転写誘導活性を抑制することは、正常眼圧緑内障の治療法となる。

[0024] 請求項15に記載の正常眼圧緑内障治療剤は、請求項14に記載されたもので、抑制剤が、NMDA阻害剤、カルシウム拮抗剤、I κ B分解阻害剤、NF- κ Bデコイオリゴ核酸、及びカルシニューリン阻害剤の何れかであることを特徴とする。

[0025] 請求項16に記載の正常眼圧緑内障治療剤は、転写調節因子NF- κ Bp50の発現の促進剤であることを特徴とする。転写調節因子NF- κ Bp50の発現を促進することは、正常眼圧緑内障の治療法となる。

[0026] 請求項17に記載の正常眼圧緑内障治療剤は、請求項16に記載されたもので、該促進剤が、NF- κ Bp50をコードする遺伝子を導入する遺伝子導入剤であることを特徴とする。このような遺伝子導入剤は、NF- κ Bp50をコードする遺伝子を導入するので、正常眼圧緑内障の治療法に用いられる。

[0027] 請求項18に記載の正常眼圧緑内障の診断方法は、被験者から採取した器官、組織、それらから採取した細胞、及び採血した血液の何れかに含まれているNF- κ Bp50の発現量又は活性を測定することを特徴とする。

[0028] 請求項19に記載の正常眼圧緑内障のリスクの予測方法は、被験者から採取した器官、組織、それらから採取した細胞、及び採血した血液の何れかに含まれているNF- κ Bp50をコードする遺伝子配列の存在を測定することを特徴とする。

発明の効果

[0029] 本発明の正常眼圧緑内障モデルは、中高年齢者ほど発症し易いヒトの正常眼圧緑内障の慢性疾患特有の症状や臨床所見に似た形態を、自発的に、月齢依存的に、確実に発症するものである。

- [0030] このモデルは、転写調節因子NF- κ Bp50欠損が月齢依存的に視神経のアポトーシスを誘発し視神経乳頭陥没を惹き起こし、かつ網膜の視神経節細胞(RGC)内に発現している蛋白質を直接認識する自己抗体の産生というヒトの正常眼圧緑内障と同様な発症メカニズムによりその患者の症状と似た形態を示す。そのためこのモデルは、この転写調節因子の活性化と視神経細胞の成長・萎縮・アポトーシスとの関連性を明らかにしたり、視神経細胞萎縮や膨潤の機序を明らかにしたりして、正常眼圧緑内障の発症メカニズムを解明するのに、有用である。
- [0031] この正常眼圧緑内障モデルを用いた評価方法によれば、簡便に再現性良く治療・診断に有用な薬物をスクリーニングして峻別することができる。さらに、この評価方法によれば、ヒトの正常眼圧緑内障発症メカニズムの解明のみならず、治療法・予防法及びそのための薬剤の開発・それによる治療効果の判定に、役立つ。
- [0032] また本発明の正常眼圧緑内障治療剤は、安全で確実に薬効を示し、簡易な治療に有用である。
- [0033] さらに、本発明の正常眼圧緑内障の診断方法や正常眼圧緑内障のリスクの予測方法により、早期発見・早期治療ができ、また前記正常眼圧緑内障治療剤により、治癒が可能である。

図面の簡単な説明

- [0034] [図1]本発明を適用する正常眼圧緑内障モデルに用いられるNF- κ Bp50欠損マウスと野生型マウスとの月齢依存的神経節細胞のアポトーシスを示す写真及びグラフである。
- [図2]本発明を適用する正常眼圧緑内障モデルに用いられるNF- κ Bp50欠損マウスとヘテロ型マウスと野生型マウスとの眼圧を示すグラフである。
- [図3]本発明を適用する正常眼圧緑内障モデルに用いられるNF- κ Bp50欠損マウスとヘテロ型マウスと野生型マウスとにおける、正常眼圧緑内障に特有な病理所見である視神経乳頭陥没と視神経の異変(視神経細胞萎縮や膨潤)とを示す写真である。
- [図4]本発明を適用する正常眼圧緑内障モデルに用いられるNF- κ Bp50欠損マウスと野生型マウスとにおける、網膜と視神経とでのグリア細胞の活性化を示す写真である。

[図5]本発明を適用する正常眼圧緑内障モデルに用いられるNF- κ Bp50欠損マウスと野生型マウスとにおける、NMDA毒性に対する網膜の視神経節細胞(RGC)の感受性を示すグラフである。

[図6]本発明を適用する正常眼圧緑内障モデルに用いられるNF- κ Bp50欠損マウスと野生型マウスとにおける、NMDA毒性に対する網膜の視神経節細胞(RGC)の感受性を示す別なグラフである。

[図7]本発明を適用する被験物質の正常眼圧緑内障治療効果を評価する方法により、正常眼圧緑内障モデルに用いられるNF- κ Bp50欠損マウスと野生型マウスとについて、被験物質の薬効を示すグラフである。

発明を実施するための好ましい形態

[0035] 以下、本発明を実施するための好ましい形態について、詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの形態に限定されるものではない。

[0036] 本発明の正常眼圧緑内障モデルは、転写調節因子NF- κ Bp50欠損マウスによって構成されるものである。

[0037] この転写調節因子NF- κ Bp50は、生体防御システムや脳神経細胞の増殖や記憶に重要であることが知られていたが、正常眼圧緑内障モデルによれば、網膜神経節細胞の増殖や電子伝達系においても重要であり、老化に伴うこの転写調節因子活性の減退による緑内障の発症や進行に關与する重要なものである。

[0038] p50(NFKB1)は、p65(RelA)に結合して、NF- κ B複合体を形成する。サブタイプにより構成されるNF- κ Bファミリーにおいて、p50(NFKB1)/p65(RelA)ヘテロダイマーは、NF- κ Bの中で最も多い型である。NF- κ B複合体は、細胞質内で捕捉することによりNF- κ Bを不活性化するI- κ B蛋白質によって、阻害されるものである。細胞外からの刺激により、キナーゼ(IKK β 又はIKK γ)によるI- κ B蛋白質上のセリン残基のリン酸化反応が生じる。リン酸化型のI- κ Bは、ユビキチン化されプロテアソームにより分解されることで、NF- κ Bがフリーになり活性化する。活性化されたNF- κ Bは、核に移行し、特定のDNA塩基配列(NF- κ B結合配列)を認識してDNAと結合し、その後、遺伝子転写を著しく活性化する。一方では、p50はDNAに結合するために必要であり、p65は遺伝子転写活性化のために本質的

に必要な因子である。

[0039] NF- κ Bの幅広い機能的な影響は、癌との関係、神経細胞可塑性との関係、及び神経疾患の治療に、関連している。中枢神経系では、NF- κ Bが神経細胞とグリア細胞とに偏在し、シナプス活性、学習、記憶、生存とアポトーシスのような様々な生理学的メカニズムに重要な役割を果たしている。

[0040] NF- κ Bは、外傷性障害、発作及び虚血のような急性神経変異、アルツハイマー病のような慢性神経変異に関わる病態生理学的症例に、介在している。一方、肝細胞等においては、NF- κ Bは、アポトーシスを阻止しているが、神経細胞においては、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)誘導性アポトーシスを促進している。

[0041] 神経細胞のアポトーシスにおけるNF- κ Bの正確な役割を明確にするために、NF- κ Bp50欠損マウスの表現型を分析したところ、網膜に関し網膜神経節細胞のアポトーシスにNF- κ Bp50が関与していることが分かった。

[0042] NF- κ Bp50欠損マウスを用いた正常眼圧緑内障モデルによる正常眼圧緑内障治療効果評価方法での月齢依存的な網膜神経節細胞の生存について検討したところ、このマウスがヒトの正常眼圧緑内障疾病に似た多くの特徴を示していた。

実施例

[0043] 以下に、本発明を適用する正常眼圧緑内障モデルを用いて、正常眼圧緑内障治療効果評価方法を行った例を、具体的に示す。

[0044] 用いた試薬・動物と、試験方法とは、以下の通りである。

[0045] (使用動物)

用いた野生型(即ち正常型)、ヘテロ型(染色体の片方のアレルのみNF- κ Bp50遺伝子が欠損)、ホモ型(染色体の両方のアレルにおいてNF- κ Bp50遺伝子が欠損)のマウスは、すべて、C57BL/6Jマウスで戻し交配によって産生したNF- κ Bp50欠損F8マウスの同腹子である。B6/129-F2遺伝子背景を持つNfkb^{1tm1Bal}のホモ型のマウスを、ジャクソン研究所(メイン州バーハーバー)から、またC57BL/6マウスを、日本クレア株式会社から、購入して試験に用いた。これらのマウスは、信州大学学内ガイドラインに従い信州大学動物棟の特定病原体感染防止(SPF)室で、飼育した。

[0046] (NF- κ Bp50欠損マウスの作製)

ターゲティングベクターを用いてNF- κ Bp50の開始メチオニンを含む遺伝子領域を相同組み換えで薬剤耐性遺伝子(具体的にはネオマイシン耐性遺伝子)に置き換え、その遺伝子からNF- κ Bp50が産生されないようにした。具体的には、ターゲティングベクターを、全能性をもつマウス胚性幹細胞(ES細胞)(129マウス系のES細胞=E14 cell:4百万細胞/mL)にエレクトロポレーション法(250ボルト、250 microF、time-constant 40-50msec、室温)で導入し、薬剤耐性(ネオマイシン類似体であるG418:150mg/mL)を指標にして相同組換えが起きた細胞を選択した。サザンブロット法により、G418によって選択された細胞が、実際にNF- κ Bp50のDNA遺伝子領域が相同組み換えで薬剤耐性遺伝子に置き変わったことを確認した。さらに、逆転写酵素-遺伝子増幅法(RT-PCR法)とウェスタンブロット法により、NF- κ Bp50のmRNAとNF- κ Bp50が、発現しないことを確認した。一般的には、上記の様な相同組み換えにより相同染色体の一方のみのNF- κ Bp50遺伝子が欠損されたES細胞(組み換えES細胞)が得られた。次に、得られた組み換えES細胞を発生させてキメラマウスを得た(Sha,W. et al. Cell 80, 321-330, 1995)。そのため、組み換えES細胞をマイクロインジェクション法や凝集法により、胚盤胞期又は8細胞期等の正常なマウス胚に注入し、その様にして得られたキメラ胚を擬妊娠状態にある雌のマウスの子宮角に移植し、この移植マウスを通常通り飼育して、キメラマウス仔を出産させることが出来た。好ましくは、組み換えES細胞をC57BL/6系マウスの胚に注入することである。このキメラマウスは、通常、その体細胞及び生殖細胞として、組み換えES細胞由来の細胞と正常細胞とを含んでなり、これを適当な系統の野生型マウス、好ましくはC57BL/6系マウス、例えばC57BL/6J系マウスと交配することでヘテロ型のF1産仔が得られた。通常通り、雄性キメラマウスと雌性野生型マウスとを交配して、F1世代のヘテロ型マウスを産出させた。交配に用いたキメラマウスの生殖細胞が、上記の組み換えES細胞、すなわち相同染色体の一方に存在する内在性NF- κ Bp50遺伝子が欠損されているES細胞に由来していれば、該遺伝子の機能が欠損した所望のヘテロ型F1マウスを得ることが出来る。F1世代において所期の遺伝子型が達成されているか否かを、その尾から抽出したDNAに対して、

サザンブロットやPCR法により分析を行うことにより確認することが、出来た。

[0047] 本発明では、NF- κ Bp50遺伝子欠損マウスの遺伝的背景を出来るだけC57BL/6系マウスに近づけることが好ましい。そのために、上記の通りに作製したF1ヘテロ型マウスを更にC57BL/6系マウス、例えばC57BL/6J系マウスと交配し、生まれてきたヘテロ型マウスを再度C57BL/6系野生型マウスと交配するという作業を繰り返す。この交配の作業を通常合計少なくとも5回、好ましくは少なくとも7回行う。この実施例においては、F1ヘテロ型マウスを更にC57BL/6J系マウスと交配し、生まれてきたヘテロ型マウスを再度C57BL/6系野生型マウスと交配するという作業を6回繰り返してF7ヘテロ型マウスを作製した。雄性F7ヘテロ型マウスと雌性F7ヘテロ型マウスとを交配して、F7世代の野生型マウス、ヘテロ型マウスおよびホモ型マウス(NF- κ Bp50遺伝子欠損マウス)を産出させ、各系統のマウスにおける眼の性状(網膜組織の性状、視神経組織の性状、眼圧等)を比較検討する。

[0048] (ウェスタンブロット分析)

マウス(NF- κ Bp50欠損F8マウス)の眼から網膜を、摘出し、変性RIPA緩衝液(50mMのTris(pH7.4)、1%のNP-40(界面活性剤)、0.25%のデオキシコール酸ナトリウム、150mMのNaCl、1mMのEDTA(エチレンジアミン四酢酸)、1mmolのNaF、1mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオライド)、1mMのNa₃VO₄、アプロチニンとロイペプチンとペプスタチンの各1 μ g/mL)中で、ホモジナイズした。この試料を、先ず10分間95°Cで加熱し、次いで、20分間15000rpmで遠心分離し、上澄みを、網膜の粗抽出物として-30°Cで保存した。この抽出物の10 μ gを、10%のSDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアセチルアミドゲル電気泳動)に付し、通常の手順に従い、NF- κ Bp65又はp50に対するウサギのポリクローナル抗体(サンタクルズ バイオテクノロジー社製、カリフォルニア州)と神経膠繊維酸性蛋白質(GFAP)に対するヤギのポリクローナル抗体(サンタクルズ バイオテクノロジー社製、カリフォルニア州)とを用いて、ウェスタンブロット分析を行った。免疫検出可能な蛋白質を、ECLウェスタンブロットシステム(GEヘルスケア バイオサイエンス社製(スウェーデン))を用い、視覚化し目的蛋白質の発現を確認した。

[0049] (網膜神経節細胞標識及び計測)

マウスを、キシラジン(10mg/kg)とケタミン(70mg/kg)との混合物の腹腔内投与によって、麻酔した。頭蓋上の皮膚を切開し、頭皮を露出させた。注射位置は、脳表面から深さ2mmで、前後直線の前頂の後方3mmで、正中線の外側0.5mmの場所である。頭皮にドリルで枠を開け、神経トレーサー染料であるフルオロゴールド(食塩水中の4%溶液、蛍光色素、デンバー社製、コロラド州)の1 μ Lを、ハミルトンシリンジにより0.5 μ L/分の速度で付した後、切開した皮膚を縫合した。フルオロゴールドを付してから5~7日後、マウスを安楽死させ、眼を摘出し、網膜を剥離し、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)中の4%パラホルムアルデヒド下で平坦な網膜の全組織標本とした。230 \times 150 μ mで同一サイズの10視野で、標識細胞数を、蛍光顕微鏡により計測した。計測した視野は、同程度に略500 μ mずつ離してある。視野を、観察者2人による盲検により計測した。各網膜の視野ごとの網膜神経節細胞の平均数は、ボンフェローニ補正法によるANOVA(分散分析)によって解析した。

[0050] (ヌクレオソームDNA断片分析)

マウスから摘出された網膜を、最終濃度で0.1%のNP-40を含む緩衝液A(10mMのTris-HCl(pH7.8)、3mMのMgCl₂、1mMのEDTA)の500mLに浸し、ホモジナイズした。2300rpmで5分間、遠心分離した後、核を単離し、最終濃度で1mg/mLのリボ核酸分解酵素A溶液と最終濃度で1mg/mLのプロテナーゼKとを含んでいる溶解溶液(50mMのTris-HCl(pH7.8)、10mMのEDTA、0.5%のラウロイルサルコシナトリウム)に再懸濁させ、50°Cで15分間インキュベートした。インキュベート後、ヌクレオソームDNAとして-30°Cで保存した後、通常の手法に従って10%のアガロースゲルに付し電気泳動を行い、ヌクレオソームDNAの断片化を検出することでアポトーシスにより細胞死を誘導されている細胞の存在を検出した。

[0051] (眼圧測定:IOP)

野生型、ヘテロ型、及びホモ型のマウス(NF- κ Bp50欠損F8マウスの同腹子)について、眼圧を測定した。まず、マウスを、ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内注射によりに浅く麻酔した。通常の方法でTonoLab反響眼圧計(コロニアルメディカルサプライ社製、テキサス州ガーランド)を用いて、麻酔誘導後10分してから順次、眼圧の測定を行った。有意差検定は、スチューデントのt検定によって

解析された。

[0052] (形態観察及び透過型電子顕微鏡法)

麻酔後、4%のパラホルムアルデヒドで灌流し、視神経を眼球の後ろ2mmの所から解剖し、固定液(0.1Mのカコジル酸塩緩衝液中、2.0%のグルタルアルデヒド及び2.0%のパラホルムアルデヒド)の約20mLに12時間浸漬した。その後、視神経を、1%の四酸化オスミウム中で後処理して固定し、エタノール中で脱水し、EPOK812(応研商事株式会社製)で包埋した。透過型電子顕微鏡観察用に、視神経の長軸と垂直に超薄切片を切出し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛とで染色し、透過型電子顕微鏡JEM1200EX(日本電子株式会社製)で観察した。また、光学顕微鏡観察には、トルイジンブルー染色を用いた。

[0053] (NMDA(N-メチル-D-アスパラギン酸塩)注射及び形態観察)

前記のようにして、繰返しNMDAを注射した。5mMのNMDAの緩衝塩類溶液(BSS)の2 μ Lを、月齢2ヶ月の各マウスの左眼の硝子体に注射した。右眼に、BSSのみを注射した。注射後、24時間後と4日後とに、眼を摘出し、PB中で4%パラホルムアルデヒドにより固定した。次いで、脱水し、パラフィンで包埋した。横断切片を、視神経乳頭から得、ヘマトキシロン及びエオシン(H&E)で染色した。神経節層に浸潤している細胞を除き、神経節細胞層の視神経乳頭の端から0.3mmの長さの所の0.35mmの細胞を計測した。各視野ごとの細胞の平均数を求め、有意差検定をスチューデントのt検定によって解析した。

[0054] (免疫組織化学染色:IHC)

パラフィンで包埋した網膜及び視神経を免疫組織化学染色の資料として用いた。切片を、脱蠟し、1%のBSA(牛の血清アルブミン)中で、インキュベートした。その後、切片を、適切な抗体と共に一晚4°Cでインキュベートした。抗体として、主に、GFAPに対するヤギのポリクローナル抗体、NF- κ Bp50又はp65に対するウサギのポリクローナル抗体(1:200, サンタクルズ バイオテクノロジー社製、カリフォルニア州)、及びCD3、CD11bおよびGr-1に対するウサギのポリクローナル抗体(BD ファミンゲン社製 カリフォルニア州)を用いた。インキュベートし終わったら、切片を、洗浄し、第2抗体であるアレクサフロア488により標識されている抗ヤギ又は抗ウサギIgG

抗体(1:200、サンタクルズ バイオテクノロジー社製、カリフォルニア州)でインキュベートした。最後に、切片を、非退色標本保存液(ベクタシールド、ベクター研究所製、カリフォルニア州)でカバースリップし、共焦点顕微鏡(ソーンウッド社製、ニューヨーク州カールゼイス)を用いて視覚化した。正常なヤギやウサギの抗血清を、対照として用いた。

[0055] (NF- κ Bp50欠損マウス中の自己抗体産生の同定)

NF- κ Bp50欠損マウスと、野生型マウスとから血清試料を得た。野生型マウスに由来するパラフィン包埋網膜切片と各マウスより採取された血清試料とを通常の免疫組織化学的手法により反応させ、網膜の蛋白質を直接認識する自己抗体の産生を確認した。ウェスタンブロット分析をするために、月齢2ヶ月の野生型マウスから網膜を抽出し、前記のような10%のSDS-PAGEに付した。免疫ブロット分析は、月齢5ヶ月でNF- κ Bp50欠損マウスと野生型マウスとから採取した血清試料を用いて行われた。

[0056] これらの実験による結果を、以下に示す。

[0057] (網膜中のNF- κ B発現の結果)

NF- κ Bは、神経系中で発現され、シナプス活性、学習及び記憶のような過程で、重要な役割を果たしている。今までに網膜中でのNF- κ Bp50の機能を検討したという報告は、なされていない。この実験は、初めて、NF- κ Bサブユニットに対する抗体との免疫組織化学及びウェスタンブロット分析による網膜中のNF- κ B発現について、検討したものである。免疫組織化学的な検討によれば、NF- κ Bp65及びp50の発現は、神経節細胞層(GCL)中の細胞の細胞質内で検出された。網膜神経節細胞は、およそ40~60%がマウスの網膜の神経節細胞層中の神経であり、細胞の半分が網膜内の無軸索神経細胞である。NF- κ Bp65及びp50発現は、網膜神経節細胞層中のほとんどすべての神経で、検出された。正常なウサギのIgGで行った免疫組織化学的検討では、検出されない。NF- κ Bp65及びp50が、神経節細胞層中の細胞の細胞質でとりわけ発現していることが、示唆された。ウェスタンブロット法によって、NF- κ Bp65、p50、及びその先駆体蛋白質であるp105の発現が、両型のマウスから得られた網膜の蛋白質粗抽出物で、夫々検出された。

[0058] (NF- κ Bp50欠損マウスの網膜の網膜神経節細胞生存の月齢依存的な減少の結果)

3週齢での組織学的検査によれば、NF- κ Bp50欠損マウスの網膜と、野生型マウスの網膜とは、何ら変わりがない。月齢5ヶ月では、夫々の網膜層は、厚さや構造の点で違いがなく、特に内顆粒層及び外顆粒層は、違いがなかった。中枢神経系で、NF- κ Bが、神経細胞とグリア細胞との両方で偏在し、シナプス活性、生存・アポトーシスのような様々な生理学的メカニズムの重要な役割を果たしている。異なる齢のNF- κ Bp50欠損マウスの網膜神経節細胞数を調べたところ、NF- κ Bp50発現が、網膜神経節細胞生存に必要なのか否かが、明らかとなった。3週齢、月齢2ヶ月、月齢5ヶ月のマウスの網膜神経節細胞数を、フルオロゴールドによる逆行性標識法で計測した。その結果を図1a及び図1bに示す。

[0059] 図1aは、網膜神経節細胞をフルオロゴールドにより付してから5～7日後に、眼を摘出し、平坦な標本にして、逆行性蛍光標識法を行った典型的な顕微鏡写真である。スケールバーは25 μ mである。

[0060] 図1bは、月齢依存的に減少するNF- κ Bp50欠損マウスの神経節細胞数を示すグラフである。平坦な標本にした網膜の同一サイズ(230×150 μ m)の10視野で、逆行性標識細胞数を、蛍光顕微鏡により計測した。計測した視野は、同程度に500 μ mずつ離してある。各網膜の視野ごとの網膜神経節細胞の平均数を計測し、ボンフェローニ補正法による分散分析(ANOVA)によって分析した。棒グラフは、3週齢、月齢2ヶ月及び月齢5ヶ月での視野ごとの網膜神経節細胞の平均数を示している。データは、平均±平均標準誤差(マウスのn数は、3週齢で各4匹、月齢2ヶ月で各3～5匹、月齢5ヶ月で各8～12匹)である。*1p<0.01は野生型マウスに対するものであり、*2p<0.01は野生型マウスに対するものである。

[0061] 図1a及び同図bに示すように、3週齢、月齢2ヶ月で明確な違いがなく神経病変が認められなかったが、月齢5ヶ月で、p50欠損F8マウスの網膜神経節細胞数は、同月齢の野生型マウスのものに比べ、顕著に減少しており、その細胞が多数死滅しているという神経病変が認められた。C57BL/6Jマウスで戻し交配して産生したF3マウスの同腹子で、さらに組織学的実験を行った。3週齢、月齢2ヶ月及び月齢5ヶ月の

マウスの網膜神経節細胞数を、逆行性標識法で計測した。3週齢、月齢2ヶ月で明確な違いがなかったが、月齢5ヶ月では、p50欠損F3マウス中の網膜神経節細胞は、同月齢の野生型マウスのものに比べ、著しく減少していた。

[0062] さらに、網膜神経節細胞生存数の減少がアポトーシスによって惹き起こされているのか否かを調べるために、網膜の切片でヌクレオソームDNA断片化分析を行った。神経節細胞のアポトーシスの検出のためのヌクレオソームDNA断片分析の結果を図1cに示す。

[0063] 図1cは、網膜を、2週齢及び月齢4ヶ月のマウスから切り採り、ヌクレオソームDNA断片分析を行ったものである。

[0064] 図1cに示すように、月齢4ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスの網膜で、ヌクレオソームDNA断片のラダーがはっきりと検出されていることが示されている。しかし月齢2ヶ月では、いずれにもヌクレオソームDNA断片のラダーは認められていない。

[0065] (野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスとの眼圧差の結果)

ヒトの緑内障では、網膜神経節細胞のアポトーシスが、高眼圧によってしばしば惹き起こされることが知られている。NF- κ Bp50欠損マウスで検出される網膜神経節細胞のアポトーシスが、ヒトの緑内障での高眼圧によって惹き起こされているか否かの可能性について検討するために、その眼圧を測定した。その眼圧測定の結果を図2に示す。

[0066] 図2は、月齢3ヶ月及び月齢6ヶ月のマウスから個々に得た各眼について眼圧を計測したものである。データは、平均±平均標準誤差(マウスのn数は、月齢3ヶ月で各5~6匹、月齢6ヶ月で各8~10匹)である。

[0067] 野生型正常マウスの眼圧は、通常、10~20mmHgであるが、図2に示すように、月齢3ヶ月と月齢6ヶ月とでは、野生型マウス、ヘテロ型マウス、NF- κ Bp50欠損マウスの各々で、眼圧差は無く、その眼圧は正常範囲内であった。このように、高眼圧による物理的な要因は、高齢のNF- κ Bp50欠損マウスでの網膜神経節細胞数の低下に関係がないと思われる。

[0068] (視神経乳頭に特有な陥没と、NF- κ Bp50欠損マウスでの視神経の異変の結果)
視神経の異変は、緑内障の末梢神経障害に際立っているもう一つの特徴であるの

で、NF- κ Bp50欠損マウスの月齢依存的な異変について検討した。ヒトの緑内障では、視神経乳頭に特有な陥没が、認められることが知られている。高齢のNF- κ Bp50欠損マウス中の視神経の形態変化を調べるために、病理組織検査を行なった。網膜での視神経乳頭辺縁部狭細化および陥没は、月齢5ヶ月までの野生型マウス、ヘテロ型マウス、NF- κ Bp50欠損マウスの各々で、認められなかったが、月齢10ヶ月でのマウスで顕著な違いが、認められた。その月齢10ヶ月での結果を、図3aに示す。

[0069] 図3aは、視神経乳頭に特有な陥没と、NF- κ Bp50欠損マウスでの視神経の異変を示すものである。図3aは、視神経乳頭の組織検査の写真であり、月齢10ヶ月のマウスから眼を切り採り、試料切片を、ヘマトキシロン及びエオシン(H&E)で染色したものである。

[0070] 図3aから明らかな通り、野生型マウスにもヘテロ型マウスにも視神経乳頭において組織学的異常が認められなかったが、NF- κ Bp50欠損マウスの視神経乳頭が顕著に陥没しているという際立った異変が認められた。

[0071] 健常人の網膜に、視神経乳頭の陥没のような組織異常が認められないことが確認されており、一方、正常眼圧緑内障患者の網膜に、視神経乳頭の陥没が特長的病理所見として、認められることが確認されている。図3aのNF- κ Bp50欠損マウスの視神経乳頭の陥没は、正常眼圧緑内障患者のみに顕明に認められる特有の視神経乳頭の陥没と、同様な病理所見であった。

[0072] 次に、高齢のNF- κ Bp50欠損マウスの視神経が局所的に損失しているか否かを調べるために、組織検査を行なった。光学顕微鏡法によると、野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスとは、視神経の断面における太さの差異は認められなかった。しかしながら、高齢のNF- κ Bp50欠損マウスでは、視神経の断面の4象限(こめかみ側、鼻側、内部側、上部側)の全てにおいて、重大な軸索変質や、視神経乳頭を通り脳へ繋がる網膜神経節細胞の著しい萎縮や膨潤が認められ、局所的な異変所見ではなかった(図3b)。したがって、視神経細胞の著しい萎縮や膨潤は、高眼圧による物理的な要因によって生じた可能性が低い。

[0073] さらに、図3cは、視神経軸索の形態的異変を検出する電子顕微鏡検査観察(倍率

:8000倍)であり、月齢5ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスの各軸索拡大領域を示したものである。スケールバーは2 μ mである。図3cから明らかなように、月齢5ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスの各軸索領域では、野生型マウスと比較して、明らかに軸索数の減少が認められた。さらに、視神経の断面図を電子顕微鏡で観察したところ、同月齢の野生型マウスと比較して、月齢5ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスでは著しい軸索の減少と視神経細胞萎縮や膨潤が認められた。NF- κ Bp50欠損マウスにおいて、軸索の減少の結果、結合組織領域が、著しく増加していた。

[0074] これらの知見は、既に報告されているような他のげっ歯類動物を用いた緑内障モデルと非常に異なっているので、極めて興味深い。明らかに視神経乳頭の陥没が認められる月齢10ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスは、神経線維層が明らかに損傷されているが、同月齢で同腹子の野生型マウスと同様に内顆粒層が目立ったアポトーシスが観察されていない。これらのことから、高眼圧により、視神経細胞の著しい萎縮や膨潤が生じた可能性が極めて低いことが、明らかとなった。

[0075] (NF- κ Bp50欠損マウスでの網膜と視神経との神経膠繊維酸性蛋白質(GFAP)発現の増大の結果)

グリア細胞は、視神経乳頭及び網膜を含む神経系中での重要な構造的で機能的な構成成分である。ヒトやマウスの眼組織中には、数種類のグリア細胞が存在する。視神経中のグリア細胞には、星状膠細胞、希突起神経膠細胞、ミクログリアがある。網膜には、グリア細胞としてミュラー細胞と星状膠細胞が存在する。何かしらの原因により中枢神経系細胞が損傷しアポトーシスあるいはネクローシスにより死細胞となると、その死細胞を排除するために、グリア細胞(星状膠細胞)が、GFAPの発現陽性となり貪食細胞として活性化する。このようなグリア細胞の変化は、ヒトの緑内障の眼や、緑内障実験モデルでは注目されていた。

[0076] 視神経乳頭の断面図の顕微鏡観察の結果を、図4aに示す。図4aは、月齢2ヶ月及び月齢5ヶ月のマウスから視神経を切り採った試料切片を、トルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡観察を行ったものである。矢印は、肥大性星状膠細胞を示している。スケールバーは10 μ mである。図4aから明らかな通り、月齢5ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスの星状膠細胞の形態が、同月齢の野生型マウスに比べ、明らかに肥大し

ていたが、月齢2ヶ月では、何れのマウスでも相違が認められなかった。

[0077] 次いで、免疫組織化学的検討を行った。その結果を図4bに示す。グリア細胞の活性化は、GFAP陽性によって判断される。図4bは、抗GFAP抗体の免疫組織化学染色による、NF- κ Bp50欠損マウスの網膜と視神経とでのグリア細胞の活性化を示している。左側に示す4つは網膜切片の断面図であり、スケールバーは10 μ mである。右側に示す4つは視神経切片の断面図であり、スケールバーは20 μ mである。

[0078] 網膜において、異なる二つのグリア細胞、即ち星状膠細胞とミュラー細胞とが、網膜中に存在している。図4b左側の4つの網膜の断面の切片を示す図のように、やや上側(網膜視神経節細胞層)の明部にある星状膠細胞と中程の暗部にあるミュラー細胞とであるグリア細胞が存在している。ミュラー細胞の活性化はGFAPで検出できないが、星状膠細胞の活性化はGFAPで染色されるので、検出できる。図4b左側の4つの図に示されているように、野生型マウスの月齢2ヶ月および5ヶ月とNF- κ Bp50欠損マウスの月齢2ヶ月との切片は、GFAPで染色されていないから星状膠細胞の活性化が認められなかったが、NF- κ Bp50欠損マウスの月齢2ヶ月との切片は、GFAPで染色されており星状膠細胞の活性化が認められた。

[0079] 図4b右側の4つの視神経の断面の切片を示す図のように、野生型マウスの月齢2ヶ月および5ヶ月とNF- κ Bp50欠損マウスの月齢2ヶ月との切片は、GFAPで染色されていないから星状膠細胞の活性化が認められなかったが、NF- κ Bp50欠損マウスの月齢2ヶ月との切片は、矢印で示すようにGFAPで染色されており星状膠細胞の活性化が認められた。

[0080] このように、図4bから明らかな通り、月齢5ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスの神経繊維層や神経節細胞で、GFAPが、野生型マウスに比べて、顕著に発現していることが分かった。月齢5ヶ月の野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスとの免疫組織化学的分析により、内顆粒層でのGFAPの免疫反応が、認められなかった。つまり、ミュラー細胞の活性化は、月齢5ヶ月の野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスともに認められなかった。月齢2ヶ月マウスでは、野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスとの網膜のGFAPで、わずかな星状膠細胞がかすかに変形していたにすぎなかった

。高齢のNF- κ Bp50欠損マウスの網膜中で、GFAP発現が増大、つまり星状膠細胞の活性化が認められた。さらに、視神経の断面図から明らかのように、NF- κ Bp50欠損マウスの視神経において星状膠細胞の肥大と一層厚い網状組織とが認められた。

[0081] 健常人の網膜組織の断面の切片で、GFAPで染色されないから星状膠細胞の活性化が認められないが、正常眼圧緑内障患者の網膜組織の断面の切片において網膜視神経節細胞層のみで、GFAPで染色されており星状膠細胞の活性化が認められることが、知られている。また、視神経の切片でも同様であることが、知られている。月齢5ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスの神経繊維層や神経節細胞の結果は、ヒトの病理所見と、極めて類似していた。

[0082] 図4cは、ウェスタンブロット分析によるNF- κ Bp50欠損マウスの網膜におけるGFAP発現を示している。各網膜は、2匹の野生型マウスと3匹のNF- κ Bp50欠損マウスとから夫々得られたもので、網膜の蛋白質粗抽出物と適切な抗体によりウェスタンブロット分析を行ったものである。図4cより明らかのように、グリア細胞の活性化マーカーであるGFAP発現は、月齢6ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスから得られた網膜の蛋白質粗抽出物で顕著に検出されたが、野生型マウスでごく微量しか検出されなかった。ウェスタンブロットの結果は、図4cに示すとおり、免疫組織化学染色の実験結果を支持している。最近の報告によれば、免疫組織化学染色によりGFAPで染色された正常なヒトのパラフィン固定網膜は、わずかな星状膠細胞がかすかに染色されていたにすぎない。それとは対照的に、ヒトの正常眼圧緑内障より得られたパラフィン固定網膜での免疫組織化学的結果は、緑内障網膜中で、GFAP陽性の星状膠細胞のみが増加していることを示している。さらに、この免疫組織化学染色の結果は、内顆粒層でGFAPの免疫反応が起こっていないことを示している。つまり、ミュラー細胞は、ヒトの緑内障網膜組織およびNF- κ Bp50欠損マウスの網膜組織中で、GFAP陽性(活性化)ではない。このように、NF- κ Bp50欠損マウスの網膜におけるGFAPの陽性細胞つまり活性化された星状膠細胞の局在性は、ヒトの緑内障の網膜組織において認められるGFAPの陽性細胞の局在化に、極めて類似している。

[0083] (NF- κ Bp50欠損マウス中でNMDA誘導神経毒性の感受性の結果)

NMDA受容体介在の神経刺激毒性は、緑内障の神経障害に関わっていることが報告されている。神経細胞はNMDA受容体を介したカリウム流出に応答してアポトーシスに至るということが知られている。そこで、NMDA誘導神経毒性でのNF- κ Bp50の影響について検討した。NMDAは、100mmolという高濃度で速やかに細胞死が起こるという神経細胞毒性を有している。NMDA誘導神経毒性を示すのに低濃度である10mmolのNMDAを硝子体腔内注射してから24時間後に、網膜の組織検査を行なった結果を図5に示す。

[0084] 図5は、NMDA処理後のNF- κ Bp50欠損マウス(月齢2ヶ月)での神経節細胞層中の生存細胞の減少数を示すものである。生存細胞は、視神経乳頭の端から各々0.3mmで0.35mmの距離の所で計測したものである。棒グラフは、処理前とNMDA処理してから24時間後のGCL中の細胞の数を示している。視野ごとの細胞の平均の数を求め、有意差検定をスチューデントのt検定によって解析した。データは、平均±平均標準誤差(マウスのn数は、6~7)である。*1p<0.01は野生型マウスに対するもので、*2p<0.01は野生型マウスに対するものである。

[0085] 図5から明らかなように、同月齢の野生型マウスよりもNF- κ Bp50欠損マウスで網膜神経節細胞が一層減少していたが、NF- κ Bp50欠損マウスと野生型マウスとでは、内網状層の厚さの相違がなかった。NMDA処理してから24時間後、野生型マウスよりもNF- κ Bp50欠損マウスの神経節細胞層や硝子体腔で、浸潤細胞が増加していることが観察された。しかし、NMDA処理してから4日後、網膜にも視神経にも浸潤細胞が検出されなかった。免疫組織化学染色により、網膜のほとんどの浸潤細胞は、CD11b陽性マクロファージとGr-1陽性好中球とであった。NF- κ Bp50欠損マウスでは、10mmolのNMDAで処理してから、24時間で神経節細胞層中でアポトーシスを誘発していたが、野生型マウスでは有意な変化が認められなかった。

[0086] NF- κ Bp50欠損マウスの網膜神経節細胞が、慢性的な生理機序により生じるアポトーシスにより死滅するため、網膜に存在するグリア細胞(具体的には星状膠細胞)がそのアポトーシスにより死滅した網膜神経節細胞を貪食して処理する食細胞として活性化しているようである。また、マクロファージと好中球は、おそらく内網状層や神経節細胞層に侵入し、NMDA処理で急性的にアポトーシスを誘発された死細胞を

貪食しているようである。NF- κ Bp50欠損マウスと野生型マウスとへのNMDA処理によりNF- κ Bが活性化していることを確かめるために、抗NF- κ Bp65抗体で免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色の結果から、野生型マウスでのNF- κ Bp50と同様に、NF- κ Bp65は神経節細胞層中の核へ著しく移行していることが認められた。このようにNF- κ Bp50欠損マウスの網膜神経節細胞中でのNF- κ B活性化に対しNMDAが影響することが分かった。

[0087] 次に、NF- κ Bp65の発現や活性強度と、正常眼圧緑内障の症状との関連性を確かめるために、下記検討を行った。

[0088] (野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスとへの異なる濃度でのNMDA誘起神経細胞毒性)

50mM、及び5mMのNMDAを、夫々硝子体内に各々直接投与し、生存する視神経節細胞を計測した。なお、コントロールとしてNMDA未投与の場合に、生存する視神経節細胞も計測した。その結果を、纏めて図6に示す。図6から明らかな通り、比較的高濃度の50mMのNMDAを投与した場合、野生型マウス及びNF- κ Bp50欠損マウスとも、NMDA投与後、24時間以内に約半数、96時間(4日間)以内にほぼ全ての視神経節細胞が、アポトーシスによって死滅していた。一方、比較的低濃度の5mMのNMDAを投与した場合、野生型マウスでは、NMDA投与後4日以降になってもほぼ全ての視神経節細胞が生存しているのに対し、NF- κ Bp50欠損マウスでは、24時間以内に約60%、96時間以内にほぼ全ての視神経節細胞が、アポトーシスによって死滅していた。このことから、視神経節細胞におけるNF- κ Bp50の発現低下は、NMDA誘導性アポトーシスへの感受性を著しく高めるということが、示された。

[0089] この結果を利用して、被験物質の正常眼圧緑内障治療効果を評価し、有効な正常眼圧緑内障治療薬を峻別するというスクリーニングに用いた例を、以下に示す。

[0090] (被験物質のスクリーニング:7日間投与コントロール群)

コントロールである磷酸緩衝生理食塩水(PBS)を、野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスとに夫々、1日1回ずつ連続して7日間、腹腔内投与後、5mMのNMDAを硝子体内に直接投与して24時間後の視神経節細胞の数を計測した。その結果を

、図7aに示す。図7aから明らかな通り、野生型マウスでは、NMDA投与処理後、24時間以内に視神経節細胞の約6%しかアポトーシスによって死滅しなかったが、NF- κ Bp50欠損マウスでは、NMDA投与処理後、24時間以内に視神経節細胞の約60%がアポトーシスによって死滅した。

[0091] (被験物質:メマンチンのスクリーニング)

アルツハイマー型痴呆治療薬として用いられるもので、グルタミン酸受容体の一つであるNMDA受容体の拮抗剤であるメマンチン(塩酸塩;10mg/kg)を、野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスとに夫々、1日1回ずつ連続して7日間、腹腔内投与後、5mMのNMDAを硝子体内に直接投与して24時間後の視神経節細胞の数を計測した。その結果を、図7bに示す。図7bから明らかな通り、野生型マウスでは、NMDA投与処理後、24時間以内に視神経節細胞の約3%しかアポトーシスによって死滅しなかったが、NF- κ Bp50欠損マウスでも、NMDA投与処理後、24時間以内に視神経節細胞の約15%しかアポトーシスによって死滅しなかった。

[0092] (被験物質:ロメリジンのスクリーニング)

偏頭痛治療薬として用いられるもので、ピペラジン系カルシウム拮抗剤であるロメリジン(塩酸塩;100mg/kg)を、野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスとに夫々、1日1回ずつ連続して7日間、ゾンデで経口投与後、5mMのNMDAを硝子体内に直接投与して24時間後の視神経節細胞の数を計測した。その結果を、図7cに示す。図7cから明らかな通り、野生型マウスでは、NMDA投与処理後、24時間以内に視神経節細胞の約2%しかアポトーシスによって死滅しなかったが、NF- κ Bp50欠損マウスでも、NMDA投与処理後、24時間以内に視神経節細胞の約28%しかアポトーシスによって死滅しなかった。

[0093] (被験物質:MK-801のスクリーニング)

NMDA受容体拮抗剤であるMK-801((5S,10R)-(-)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-シベンゾ-[a,d]-シクロヘプタン-5,10-イミノハイドロゲンマレート))(10mg/kg)を、野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスとに夫々、1日1回ずつ連続して7日間、腹腔内投与後、5mMのNMDAを硝子体内に直接投与して24時間後の視神経節細胞の数を計測した。その結果を、図7dに示

す。図7dから明らかな通り、野生型マウスでは、NMDA投与処理後、24時間以内に視神経節細胞の約2%しかアポトーシスによって死滅しなかったが、NF- κ Bp50欠損マウスでも、NMDA投与処理後、24時間以内に視神経節細胞の約9%しかアポトーシスによって死滅しなかった。

[0094] 以上の結果から、これら被験物質、特に塩酸メマンチン及びMK-801は、視神経節細胞をNMDA誘導性アポトーシスから保護する作用を有していることが明らかとなった。

[0095] ところで、神経細胞は、NMDA-受容体を介したカリウム流出に応答してアポトーシスに至ることが、知られている。NMDA誘導性アポトーシスは、カルシウムの神経細胞への流入により脱リン酸化酵素カルシニューリンを活性化させる。つまり、カルシニューリンの活性化が、神経細胞をアポトーシスへと誘導すると、考えられている。脳硬塞により虚血状態に陥った神経細胞では、一過性にカルシニューリンの活性化が著しく高まり、これにより神経細胞がアポトーシスに至ると、考えられている。カルシニューリンの阻害剤であるFK506(プロGRAF)は、サイトカイン産生を抑制する免疫抑制剤として作用するもので、脳硬塞での損傷から神経細胞を保護することが、明らかにされている。そこで、FK506の視神経節細胞をNMDA誘導性アポトーシスから保護する効果について、検討した。

[0096] (被験物質:FK506のスクリーニング)

コントロール群は、前記のPBSの7日間投与コントロール群に代えて2週間投与したこと以外は前記と同様にしたものである。この2週間投与コントロール群は、図7eの通りである。一方、FK506(3mg/kg)を、野生型マウスとNF- κ Bp50欠損マウスとに夫々、1日1回ずつ連続して2週間、腹腔内投与後、5mMのNMDAを硝子体内に直接投与して24時間後の視神経節細胞の数を計測した。その結果を、図7fに示す。図7fから明らかな通り、野生型マウスでは、NMDA投与処理後、24時間以内に視神経節細胞の約5%しかアポトーシスによって死滅しなかったが、NF- κ Bp50欠損マウスでも、NMDA投与処理後、24時間以内に視神経節細胞の約34%しかアポトーシスによって死滅しなかった。

[0097] 以上の結果から、FK506は、視神経節細胞をNMDA誘導性アポトーシスから保

護する作用を有していることが明らかとなった。

[0098] (NF- κ Bp50欠損マウス中での網膜神経節細胞に対する自己抗体の産生の結果)

既に、網膜神経節細胞に対する自己抗体が、緑内障患者の神経障害の進行に、関与している可能性が報告されている。最近、NF- κ Bp50欠損マウスでの自己抗体が産生することも報告されている。NF- κ Bp50欠損マウス中で網膜神経節細胞に対する自己抗体が産生させているか否かを確認するために、NF- κ Bp50欠損マウスや野生型マウスから得た血清で免疫組織化学染色を行った。神経節細胞層は、NF- κ Bp50欠損マウスから得た血清ではっきりと染色されたが、野生型マウスから得た血清では染色されなかった。さらに、高齢のNF- κ Bp50欠損マウス中で自己免疫作用の可能性を確認するために、NF- κ Bp50欠損マウスと野生型マウスとから得た抗血清でウェスタンブロット分析を行った。同解析結果より、正常な網膜の蛋白質粗抽出物内に存在する蛋白質を直ちに認識する複数種類の自己抗体が、月齢5ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスで産生されている可能性が示されたが、野生型マウスから検出されなかった。ウェスタンブロット分析の結果は、抗血清による免疫組織化学染色の実験結果を支持している。高齢のNF- κ Bp50欠損マウス中で自己抗体が産生されている可能性が示され、またこの自己免疫メカニズムが、網膜神経節細胞のアポトーシスに関与しているかもしれないことが示された。

[0099] 以上のことから、NF- κ Bp50欠損マウスは、ヒトの中高齢者に認められる網膜神経節細胞のアポトーシスによる死滅、視神経乳頭の顕著な陥没、網膜に存在する星状膠細胞の活性化、視神経細胞の萎縮や膨潤、自己抗体の産生、月齢に関連なく一定した眼圧のような正常眼圧緑内障の臨床所見と、類似する点が多いから、正常眼圧緑内障を自発的に発症する動物モデルであることが、確かめられた。

[0100] 次に、このNF- κ Bp50欠損マウスの正常眼圧緑内障モデルを用いて、ヒトの正常眼圧緑内障に有効な薬剤の探索を行う別な正常眼圧緑内障治療効果評価方法について、検討することにした。

[0101] 正常眼圧緑内障患者の大多数が前兆症状性偏頭痛を患っているという臨床所見から、正常眼圧緑内障と前兆症状性偏頭痛、両疾患において共通のリスクファクター

が存在している可能性が示されている。従って、正常眼圧緑内障の治療に、偏頭痛治療用のCa拮抗剤が有効である可能性がある。前兆症状性偏頭痛のリスクファクターの解析により同疾患の染色体上の感受性ローカスが、4番染色体24(4q24)であることが知られている。驚くべきことに、NF- κ Bp50(MIN:164011)の遺伝子は、4番染色体24(4q24)にコードされている。つまり、NF- κ Bp50の非活性が、正常眼圧緑内障のリスクファクターの一つである可能性が示されている。NMDA等の刺激により誘導されるCaシグナルカスケードには、NF- κ Bの活性化が関与している。したがって、Ca拮抗剤はNF- κ Bの活性化を抑制する。そのため、ジヒドロピリジン誘導体やベンゾジアゼピン誘導体やパパベリン誘導体のようなCa拮抗剤が正常眼圧緑内障の治療薬となる可能性がある。本発明の評価方法によれば、ヒトの緑内障の組織を用いてp50の発現を、検討することが可能であり、現在検討を行っている。

[0102] 以上、詳細に説明したように、NF- κ Bp50欠損マウスでは、月齢4ヶ月以降になると視神経節細胞のアポトーシスが認められ、月齢5ヶ月以降で顕著な視神経節細胞数の減少が認められる。さらに、月齢5ヶ月では認められなかった視神経繊維層の萎縮が、月齢7ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスの網膜で認められた。そして、月齢10ヶ月のNF- κ Bp50欠損マウスの網膜において、著しい視神経乳頭陥没が認められた。NF- κ Bp50欠損マウスの網膜の視神経節細胞のアポトーシスによる死滅が、最初に認められ、後に視神経繊維層の萎縮や視神経乳頭陥没が徐々に生じてくることを確認した。

[0103] ヒトの正常眼圧緑内障の年齢別有病率は、年齢30～49歳(0.93%)、年齢50～69歳(1.86%)、年齢70歳以上(4.89%)であり、正常眼圧緑内障は中高年齢層から徐々に発症が認められる。このようなNF- κ Bp50欠損マウスの網膜異常症状の罹患率は、ヒトの正常眼圧緑内障の年齢別有病率に極めて類似している。

産業上の利用可能性

[0104] 本発明の正常眼圧緑内障モデルは、ヒトの正常眼圧緑内障に関与しているNF- κ Bp50が欠損した非ヒト哺乳動物やその細胞を用いたものであるから、このモデルを用いた正常眼圧緑内障治療効果評価方法は、同じく哺乳類であるヒトの正常眼圧緑内障の発症メカニズムの解明、病因の特定、治療薬や予防薬の探索、治療法や

予防法の開発等の実験に、用いることができる。

- [0105] 本発明の正常眼圧緑内障治療剤は、病因の不明な正常眼圧緑内障を治療するのに有用である。さらに本発明の正常眼圧緑内障の診断方法や正常眼圧緑内障のリスクの予測方法により、正常眼圧緑内障の早期発見・早期治療の資することができ、また併せてこの正常眼圧緑内障治療剤により、治癒が可能である。

請求の範囲

- [1] 転写調節因子NF- κ Bp50が欠損しそれにより月齢に応じて正常眼圧緑内障症状を自発的に発現する非ヒト哺乳動物、その器官若しくは組織、又はそれらの何れかから採取した細胞であることを特徴とする正常眼圧緑内障モデル。
- [2] 該非ヒト哺乳動物がマウスであることを特徴とする請求項1に記載の正常眼圧緑内障モデル。
- [3] 転写調節因子NF- κ Bp50が欠損しそれにより月齢に応じて正常眼圧緑内障症状を自発的に発現する非ヒト哺乳動物、その器官若しくは組織、又はそれらの何れかから採取した細胞へ、被験物質を投与又は添加し、該器官、該組織、及び／又は該細胞について、形態異常、細胞数、圧力、蛋白質の発現量若しくは活性強度、核酸の発現量、及び／又は抗体の活性強度を指標として測定をして、該被験物質の正常眼圧緑内障治療効果を評価する方法。
- [4] 該非ヒト哺乳動物を該被験物質の該投与の条件下及び非投与の条件下で夫々飼育し、又は該細胞を該被験物質の該添加の条件下及び非添加の条件下で夫々培養する第1工程、
該指標を観察、測定、又は検出することにより該測定をする第2工程、
該投与の条件下と該非投与の条件下との各々の該指標を比較し、又は該添加の条件下と該非添加の条件下との各々の該指標を比較することにより、該被験物質を該評価して峻別する第3工程
を有することを特徴とする請求項3に記載の評価方法。
- [5] 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項3に記載の評価方法。
- [6] 該器官又は該組織が、眼、網膜、視神経、網膜神経節細胞、網膜神経節層、網膜神経繊維層、網膜顆粒層、網膜網状層、視神経軸索、又は視神経乳頭であることを特徴とする請求項3に記載の評価方法。
- [7] 該被験物質とは別に、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)又はその塩を、投与又は添加することを特徴とする請求項4に記載の評価方法。
- [8] 該被験物質が、NMDA阻害剤、カルシウム拮抗剤、I κ B分解阻害剤、NF- κ Bデコイオリゴ核酸、及びカルシニューリン阻害剤の少なくとも何れかであることを特徴

とする請求項3に記載の評価方法。

[9] 非ヒト哺乳動物の個体、又は該非ヒト哺乳動物若しくはヒトの細胞に、被検物質を投与又は添加し、該個体中又は該細胞内での転写調節因子NF- κ Bp50の発現量又は活性強度を指標として測定をして、該被験物質の正常眼圧緑内障治療効果を評価する方法。

[10] 該細胞を該被験物質の該添加の条件下及び非添加の条件下、培養液中で夫々培養する第1工程、

該細胞内又は該培養液中で、該転写調節因子NF- κ Bp50の発現量又は活性強度である該指標を該測定する第2工程、

該添加の条件下と該非添加の条件下との各々の該指標を比較して、該添加の条件下での該発現量の増加又は該活性強度の増強により、該被験物質を該評価して峻別する第3工程

を有することを特徴とする請求項9に記載の評価方法。

[11] 該細胞が、転写調節因子NF- κ Bp50の欠損により月齢に応じて正常眼圧緑内障症状を自発的に発現する該非ヒト哺乳動物に由来して、若しくは緑内障患者である該ヒトに由来して、単離されたものであり、又はその細胞株であることを特徴とする請求項10に記載の評価方法。

[12] 該非ヒト哺乳動物を該被験物質の該投与の条件下及び非投与の条件下で夫々飼育する第1工程、

該非ヒト哺乳動物の血液中又は細胞内での該転写調節因子NF- κ Bp50の発現量又は活性強度である該指標を該測定する第2工程、

該投与の条件下と該非投与の条件下との各々の該指標を比較して、該投与の条件下での該発現量の増加又は該活性強度の増強により、該被験物質を該評価して峻別する第3工程

を有することを特徴とする請求項9に記載の評価方法。

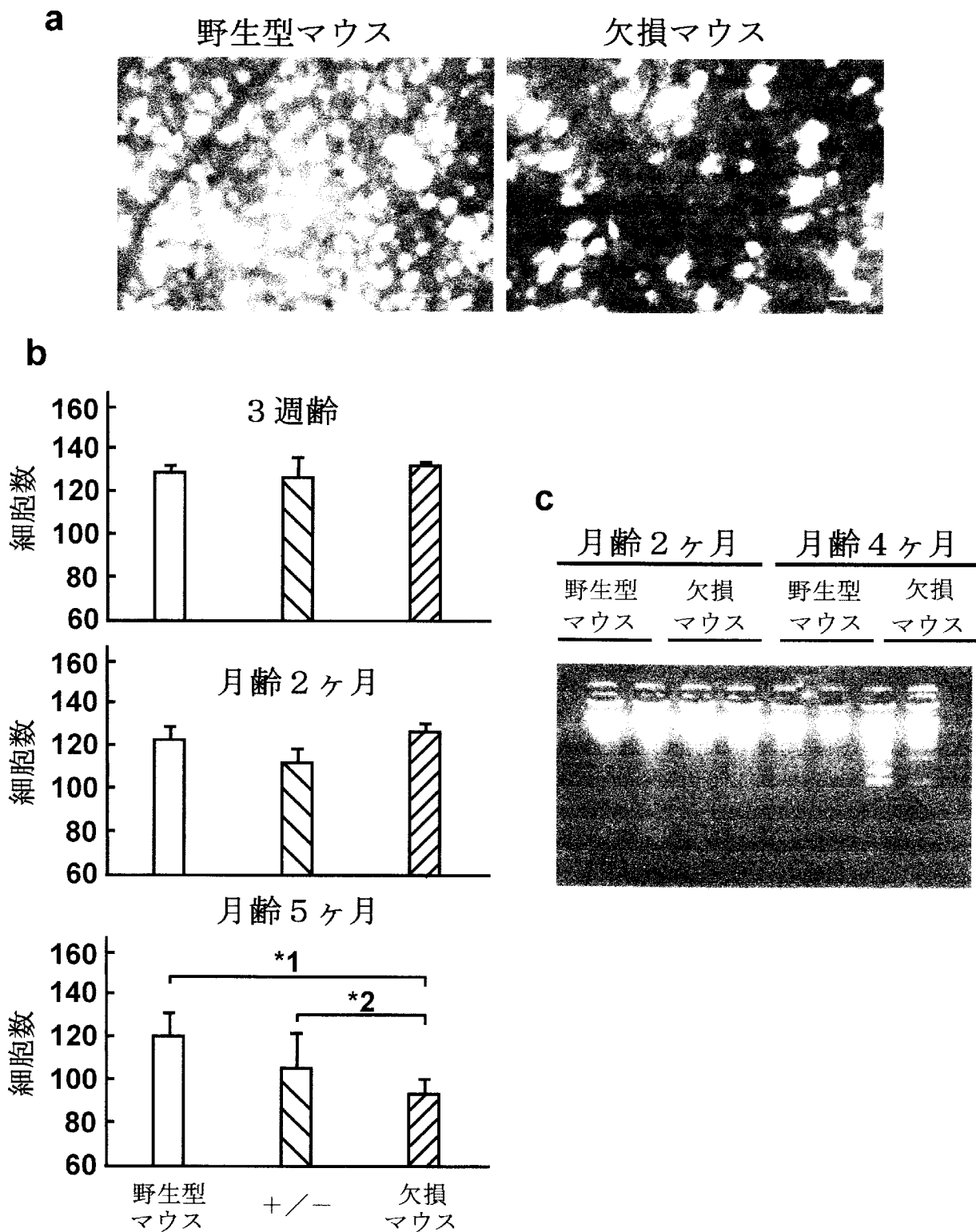
[13] 該非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項11に記載の評価方法。

[14] 転写調整因子NF- κ Bの転写誘導活性の抑制剤であることを特徴とする正常眼圧緑内障治療剤。

- [15] 該抑制剤が、NMDA阻害剤、カルシウム拮抗剤、I κ B分解阻害剤、NF- κ Bデ
コイオリゴ核酸、及びカルシニューリン阻害剤の何れかであることを特徴とする請求項
14に記載の正常眼圧緑内障治療剤。
- [16] 転写調節因子NF- κ Bp50の発現の促進剤であることを特徴とする正常眼圧緑
内障治療剤。
- [17] 該促進剤が、NF- κ Bp50をコードする遺伝子を導入する遺伝子導入剤であるこ
とを特徴とする請求項16に記載の正常眼圧緑内障治療剤。
- [18] 被験者から摘出した器官、組織、それらから採取した細胞、及び採血した血液の何
れかに含まれているNF- κ Bp50の発現量又は活性を測定することを特徴とする正
常眼圧緑内障の診断方法。
- [19] 被験者から採取した器官、組織、それらから採取した細胞、及び採血した血液の何
れかに含まれているNF- κ Bp50をコードする遺伝子配列の存在を測定することを
特徴とする正常眼圧緑内障のリスクの予測方法。

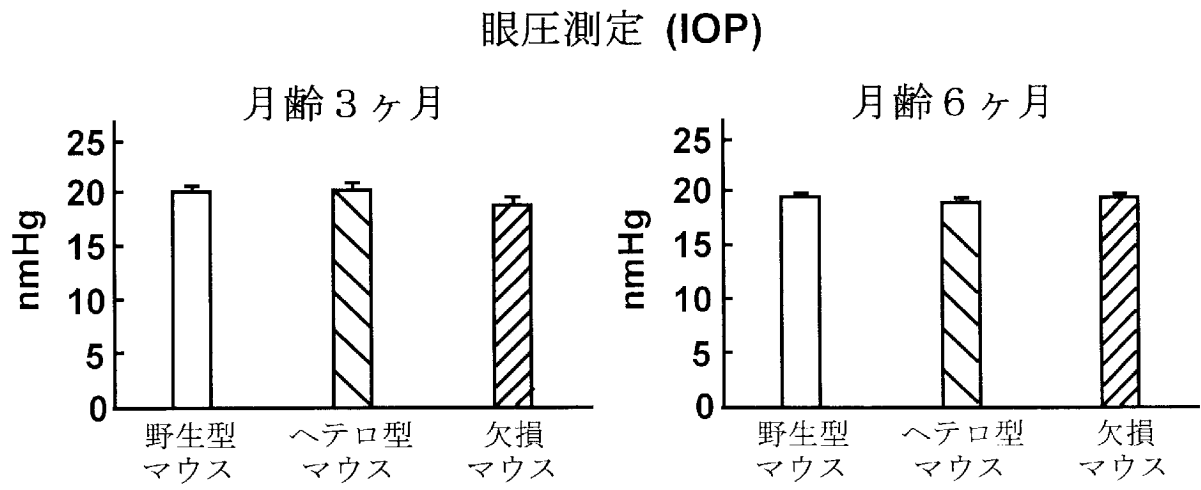
[図1]

図 1



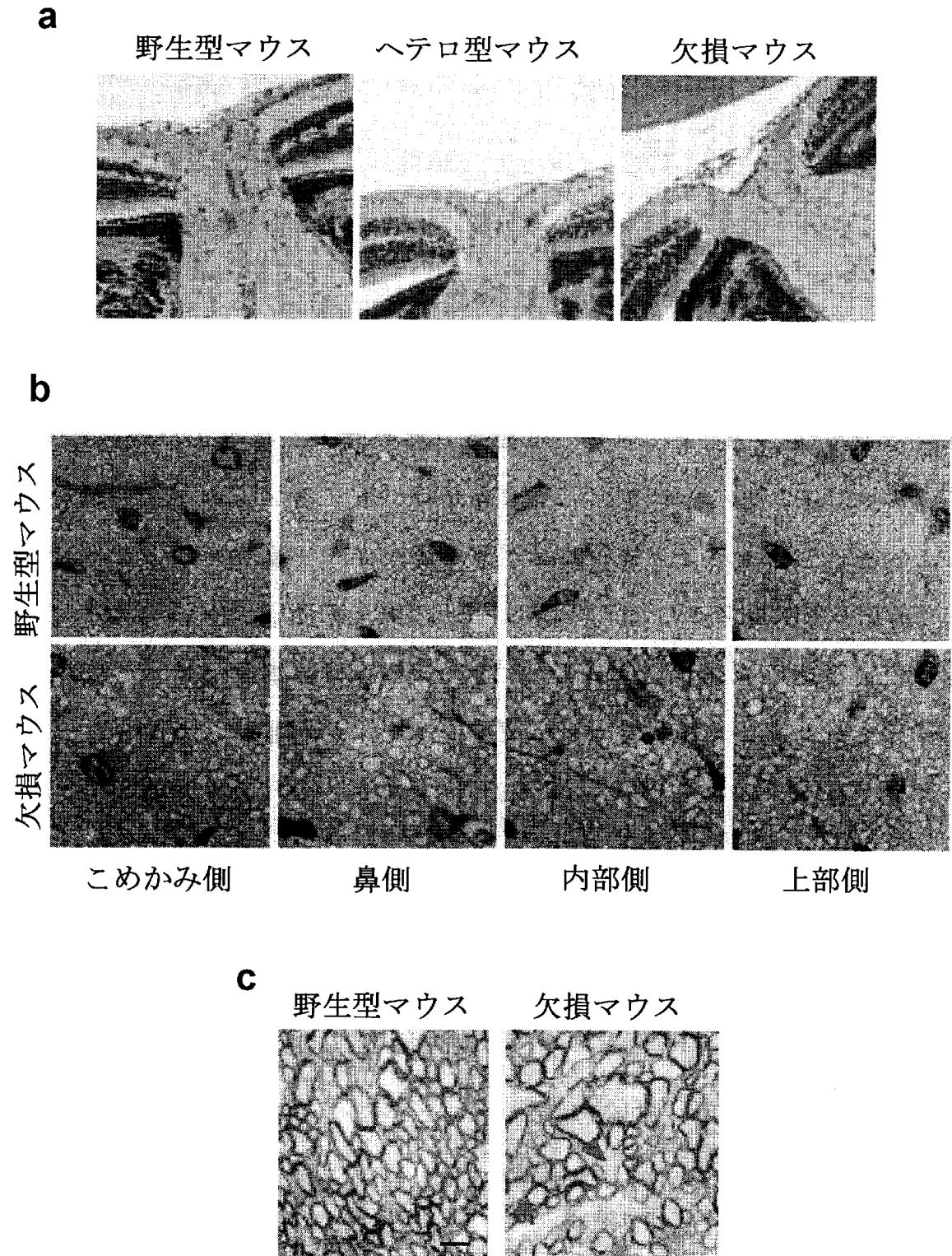
[図2]

図 2



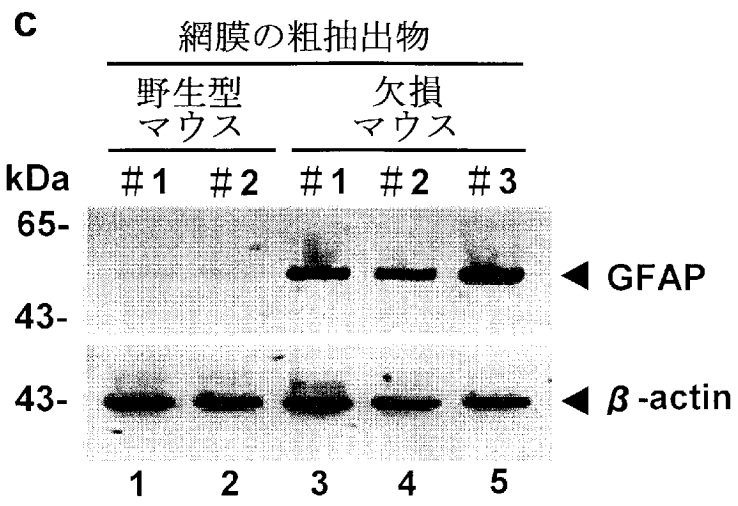
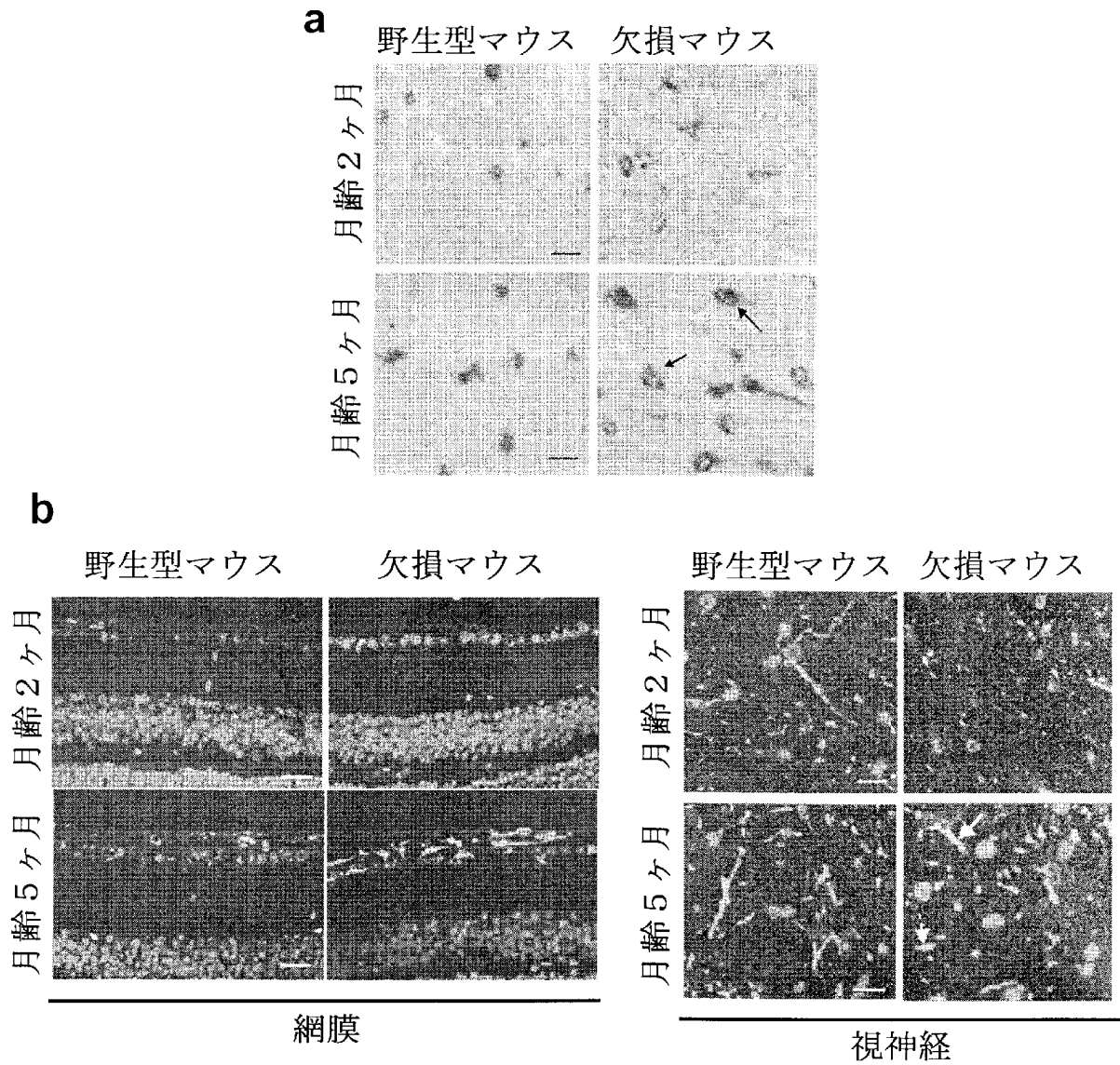
[図3]

図 3



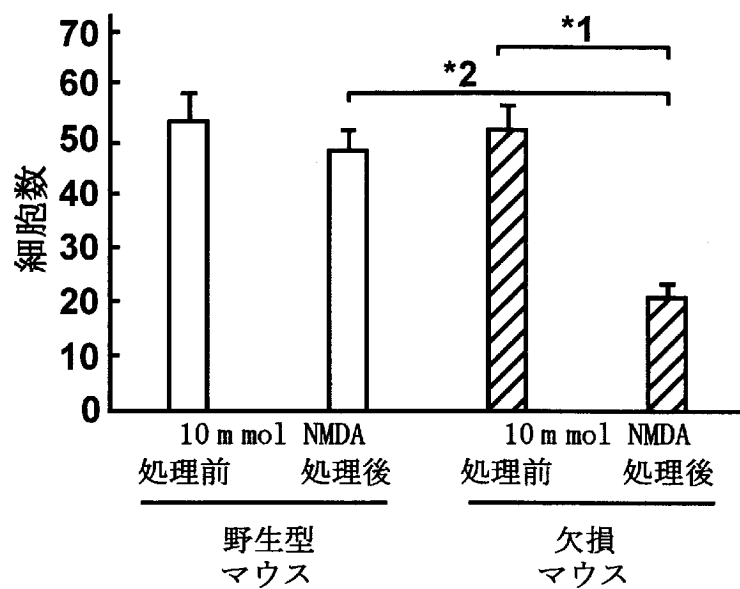
[図4]

図 4



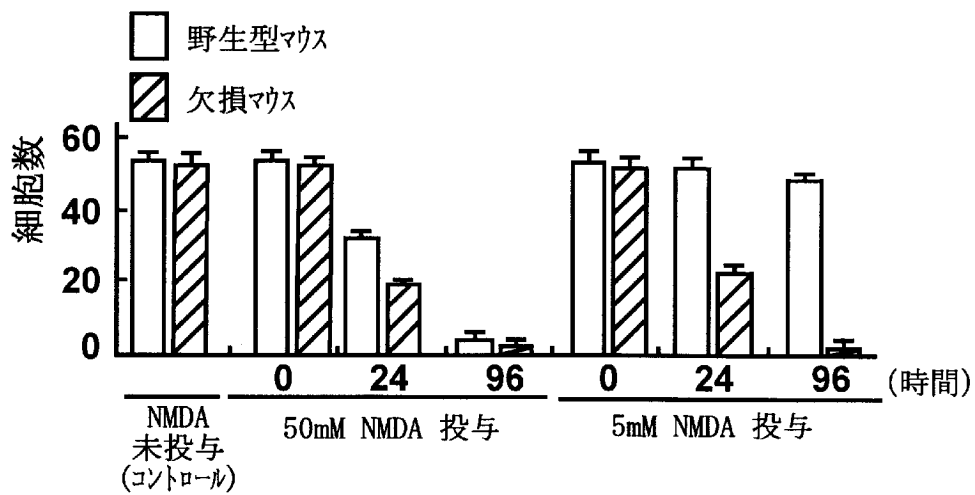
[図5]

図 5



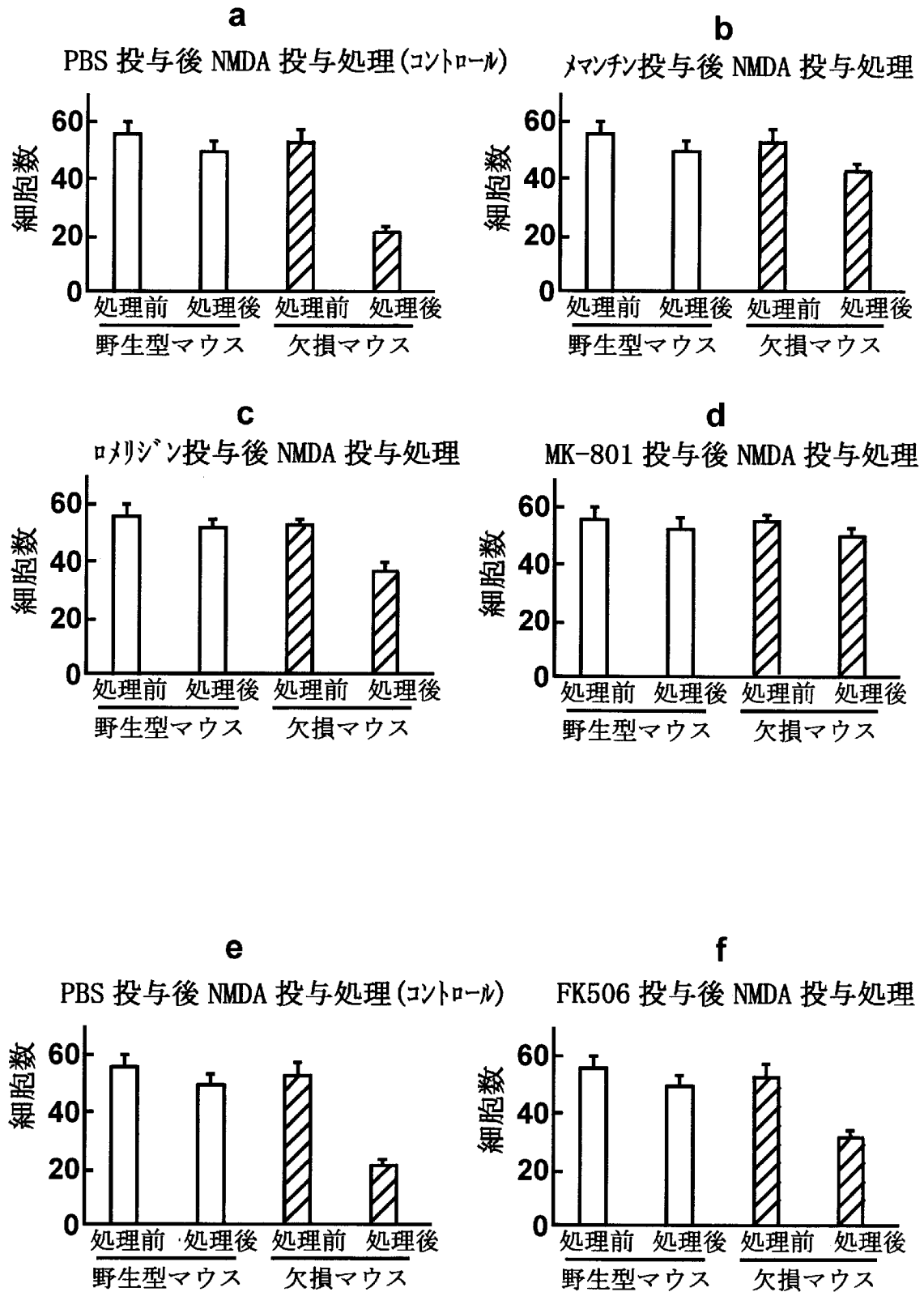
[図6]

図 6



[図7]

図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A01K67/027(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P27/06(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K67/027, A61K38/22, A61K45/00, A61K48/00, A61P27/06, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/68, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	TAKAHASHI, Y et al., Development of spontaneous optic neuropathy in NF-kappaBetap50-deficient mice: requirement for NF-kappaBetap50 in ganglion cell survival. Neuropathol Appl Neurobiol. 2007 Dec, vol.33(6), pp.692-705	1-19
A	WO 2004/092371 A1 (Japan Science and Technology Agency), 28 October, 2004 (28.10.04), & US 2007/0011758 A1 & EP 1619248 A1	1-19
A	JP 2004-313188 A (Santen Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 November, 2004 (11.11.04), & WO 2004/086858 A1	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 August, 2008 (08.08.08)		Date of mailing of the international search report 19 August, 2008 (19.08.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062616

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MILLER, AM et al., Lactate treatment causes NF-kappaB activation and CD44 shedding in cultured trabecular meshwork cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Apr, vol.48(4), pp.1615-1621	1-19
A	WANG, N et al., Ultrasound activates the TM ELAM-1/IL-1/NF-kappaB response: a potential mechanism for intraocular pressure reduction after phacoemulsification. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 May, vol.44(5), pp.1977-1981	1-19
A	KRISHNAMOORTHY, RR et al., Photo-oxidative stress down-modulates the activity of nuclear factor-kappaB via involvement of caspase-1, leading to apoptosis of photoreceptor cells. J Biol Chem. 1999 Feb 5, vol.274(6), pp.3734-3743	1-19
A	KORHONEN, P et al., Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappa B in rat brain. Neurosci Lett. 1997 Mar 28, vol.225(1), pp.61-64	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A01K67/027(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P27/06(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A01K67/027, A61K38/22, A61K45/00, A61K48/00, A61P27/06, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2008年
日本国実用新案登録公報	1996-2008年
日本国登録実用新案公報	1994-2008年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII), 医学・薬学予稿集全データベース

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	TAKAHASHI, Y et al., Development of spontaneous optic neuropathy in NF-kappaBetap50-deficient mice: requirement for NF-kappaBetap50 in ganglion cell survival. Neurobiol Appl Neurobiol. 2007 Dec, vol. 33(6), pp. 692-705	1-19
A	WO 2004/092371 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2004. 10. 28 & US 2007/0011758 A1 & EP 1619248 A1	1-19

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
08. 08. 2008

国際調査報告の発送日
19. 08. 2008

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 長井 啓子
 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2004-313188 A(参天製薬株式会社)2004. 11. 11 & WO 2004/086858 A1	1-19
A	MILLER, AM et al., Lactate treatment causes NF-kappaB activation and CD44 shedding in cultured trabecular meshwork cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Apr, vol. 48(4), pp. 1615-1621	1-19
A	WANG, N et al., Ultrasound activates the TM ELAM-1/IL-1/NF-kappaB response: a potential mechanism for intraocular pressure reduction after phacoemulsification. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 May, vol. 44(5), pp. 1977-1981	1-19
A	KRISHNAMOORTHY, RR et al., Photo-oxidative stress down-modulates the activity of nuclear factor-kappaB via involvement of caspase-1, leading to apoptosis of photoreceptor cells. J Biol Chem. 1999 Feb 5, vol. 274(6), pp. 3734-3743	1-19
A	KORHONEN, P et al., Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappa B in rat brain. Neurosci Lett. 1997 Mar 28, vol. 225(1), pp. 61-64	1-19