

(19)日本国特許庁 (JP)

# 再公表特許 (A1)

(11)国際公開番号

## WO 98 / 1 5 1 7 3

発行日 平成12年2月2日 (2000.2.2)

(43)国際公開日 平成10年4月16日 (1998.4.16)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I
A 0 1 K	67/027	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

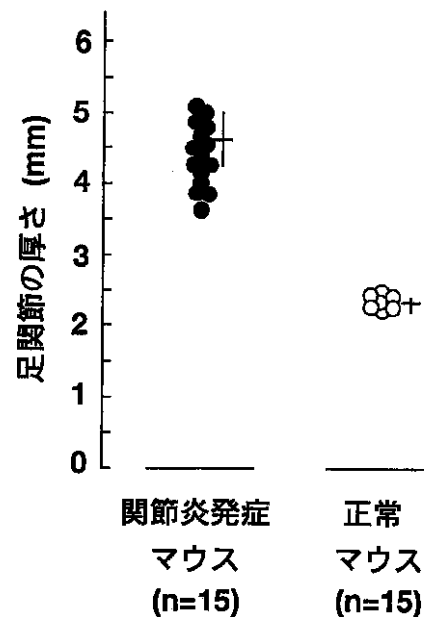
<p>出願番号 特願平10-517383</p> <p>(21)国際出願番号 PCT/J P 9 7 / 0 3 5 9 1</p> <p>(22)国際出願日 平成9年10月7日 (1997.10.7)</p> <p>(31)優先権主張番号 特願平8-267126</p> <p>(32)優先日 平成8年10月8日 (1996.10.8)</p> <p>(33)優先権主張国 日本 (JP)</p> <p>(81)指定国 JP, US</p>	<p>(71)出願人 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町4丁目1番8号</p> <p>(71)出願人 財団法人東京都老人総合研究所 東京都板橋区柴町35番2号</p> <p>(72)発明者 坂口 志文 東京都板橋区東新町1-1-1-603</p> <p>(74)代理人 弁理士 平木 祐輔</p>
---	---

(54)【発明の名称】 自己免疫性関節炎を自然発症するマウス

(57)【要約】

本発明は、ヒトに発症するリウマチ性関節炎に酷似した病態を自然発症するマウスを提供する。このマウスは、該疾患のモデル動物として利用できる。

図13



【特許請求の範囲】

- 1 . 自己免疫性関節炎を自然発症するという形質を有し、かつその形質がS K G 系統に由来することを特徴とするマウス。

## 【 発 明 の 詳 細 な 説 明 】

## 自 己 免 疫 性 関 節 炎 を 自 然 発 症 す る マ ウ ス

発 明 の 技 術 分 野

本 発 明 は、 ヒ ト に 発 症 す る リ ウ マ チ 性 関 節 炎 に 酷 似 し た 病 態 を 自 然 発 症 す る マ ウ ス に 関 す る。 こ の マ ウ ス は、 該 疾 患 の モ デ ル 動 物 と し て 有 用 で あ る。

発 明 の 背 景 技 術

自 己 免 疫 病 の な か で も、 リ ウ マ チ 性 関 節 炎 は、 最 も 頻 度 の 高 い 疾 患 で あ り、 例 え ば、 米 国 で の 罹 患 者 は 約 6 5 0 万 人 に も 達 す る。 こ の 疾 患 の 原 因、 発 症 機 構 は、 現 在 の と こ ろ 不 明 と い っ て よ い。

こ の よ う な 疾 患 の 発 症 機 構 の 解 明 の た め に は、 そ の 疾 患 に 酷 似 し た 病 態 を 自 然 発 症 す る モ デ ル 動 物 が 有 用 で あ る。 リ ウ マ チ 性 関 節 炎 と 同 様 に 自 己 免 疫 性 の 疾 患 で あ る 自 己 免 疫 性 糖 尿 病 に つ い て は、 既 に、 N O D マ ウ ス と 呼 ば れ る 有 用 な モ デ ル 動 物 が 開 発 さ れ て い る ( Makini, S ら Exp. Animals (Tokyo) 29, 1-13, 1980. )。 ま た 全 身 性 紅 斑 性 狼 瘡 ( S L E ) の モ デ ル と し て N Z B、 N Z W マ ウ ス が 広 く 用 い ら れ て い る ( Andrews, B. S. ら J. Exp. Med. 148, 1198-1215, 1978)。 い ず れ も 該 疾 患 の 原 因、 発 症 機 構 の 解 明 に、 お お い に 寄 与 し て い る。

リ ウ マ チ 性 関 節 炎 に 関 し て も、 該 疾 患 に 類 似 し た 病 態 を 示 す モ デ ル 動 物 が 既 に い く つ か 知 ら れ て い る。 例 え ば、 MRL-lpr/lpr マ ウ ス は、 主 と し て 足 関 節 に 関 節 炎 が 自 然 発 症 す る ( Hang, L. ら J. Exp. Med. 155:1690, 1982)。 し か し、 同 マ ウ ス の 関 節 炎 は 一 般 に 軽 度 で あ り、 し か も リ ン パ 節 の 異 常 増 殖 性 腫 張 に よ り 長 時 間 の 維 持 が 困 難 で あ る た め、 関 節 炎 モ デ ル と し て 広 く 用 い ら れ る に は 至 っ て い な い。 ま た、 関 節 に 多 い II 型 コ ラ ー ゲ ン を 強 力 な ア ジ ュ バ ン ト と と も に マ ウ ス に 免 疫 し て 発 症 さ せ る コ ラ ー ゲ ン 関 節 炎 ( Stuart, J. M. ら Annual Rev. Immunol. 2:199, 1984. )、 結 核 死 菌 を ラ ッ ト に 免 疫 し て 誘 導 す る ア ジ ュ バ ン ト 関 節 炎 ( Taurog, J. D. ら Cell. Immunol. 75:271, 1983 ) な ど は リ ウ マ チ 性 関 節 炎 と 類 似 し た 病 態 を 示

す。 し か し な が ら、 ヒ ト の リ ウ マ チ 性 関 節 炎 で II 型 コ ラ ー ゲ ン の 異 常、 ま た 結 核 菌 の 感 染 と の 関 係 は 証 明 さ れ て い な い。 従 っ て、 こ れ ら の モ デ ル 動 物 を 用 い て 得

られた知見が、必ずしも、ヒトに外挿できるとは限らず、ヒトのリウマチ性関節炎のモデルと成り得るかが疑問視されている。

#### 発明が解決しようとする課題

リウマチ性関節炎の治療法の開発のためにも、ヒトのリウマチ性関節炎と同じように自然発症し、リウマチ性関節炎の免疫病理学的特徴を備えたモデル動物が必要である。本発明は、かかる要望に応えるものであり、その目的とするところは、ヒトのリウマチ性関節炎と酷似した病態を自然発症するヒト疾患モデルマウスを提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者は、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、正常BALB/cコロニーの中に、関節腫張のみられるマウスを見出し、この知見に基づき本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、自己免疫性関節炎を自然発症するという形質を有し、かつその形質がS K G系統に由来することを特徴とするマウスである。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のマウスは、自己免疫性関節炎を自然発症するという形質を有し、その形質がS K G系統に由来することを特徴とする。自己免疫性関節炎の発症時期は、個体間で差異があるが、通常生後3カ月～4カ月程度で発症する。従来技術の欄で述べたように、自己免疫性関節炎を自然発症するマウスとしては、MRL-lpr/lpr マウスが知られている。しかし、本発明のマウスとMRL マウスは、その病態において相違する。例えば、MRLマウスの関節炎は、一般に後肢関節に限局しており、慢性に進行しても関節硬直に至ることはないが、本発明のマウスの関節炎は前肢後肢の関節に発症し、慢性的に進行の後、関節硬直に至る。また、本発明のマウスでは、MRLマウスに見られるリンパ球の異常増殖あるいはS L E様病変はみられない。

本発明のマウスにみられる自己免疫性関節炎は、ヒトに発症するリウマチ性関節炎と酷似した病態を示す。具体的には、以下のような類似点がある。

1) パンヌスの出現から関節軟骨、骨の破壊に慢性的に進行する点、リンパ球浸

潤を伴う炎症性関節破壊である点で、病理組織学的にヒトのリウマチ性関節炎と酷似している（図9及び図11）。

2) 臨床的に、前後肢大小関節が対称的に関節炎を起こす点、病変が慢性的に進行し、最終的に関節硬直に至る点で、ヒトのリウマチ性関節炎と似ている（図1、図3、図5、図7）。

3) 血中リウマチ因子、及び関節に特異的であるII型コラーゲンに対する自己抗体が出現する点、また高ガンマグロブリン血症が高頻度に出現する点で、ヒトのリウマチ性関節炎と似ている（図14、図15、図16）。

以上の類似点から、本発明のマウスは、ヒトのリウマチ性関節炎の疾患モデルマウスとして使用できる。

本発明のマウスは、このSKG系統のマウス間の交配により、また他の適当なマウスと交配し、その中から上記したような形質を有するマウスを選抜することにより作出することができる。なお、本出願人はSKG系統のマウスを特許法施行規則第27条の3第1項の規定に準じて分譲する用意がある。

#### 実施例

##### [ 実施例 1 ]

1993年、理化学研究所において、系統維持中のBALB/c(1992年、日本SLCより購入)コロニー中に関節腫張のみられる雌マウスを見出した。この関節腫張は、遺伝的突然変異によるものと考え、この突然変異系統をSKGと命名し、その遺伝子の性質を調べるため、以下の実験を行った。

関節炎を発症したSKGマウスを、他のBALB/cマウス(もともと日本SLCより購入)と交配した。交配の結果、12個体のマウスが得られ、そのうち4個体(雌3匹、雄1匹)に関節腫張がみられた(関節炎発症率33%)。関節腫張がみられたマウスの中から任意の1個体を選抜し、当研究室で維持しているマウスコロニー中のBALB/cマウス(もともと日本SLCより購入)と再度交配した。交

配の結果、15個体のマウスが得られ、そのうち6個体(雌4匹、雄2匹)に関節腫張がみられた(関節炎発症率40%)。さらに、前記と同様に、関節腫張のみられたマウスの中から任意の1個体を選抜し、これを上述のBALB/cマウスと交

配した。この結果、28個体のマウスが得られ、そのうち10個体に関節腫張がみられた(関節炎発症率35%)。以上3代にわたる交配の結果、関節炎は、正常と思われたBALB/c個体との交配により、雌雄共に30~40%の割合で発症した。

以上の実験において、交配に用いたBALB/cマウスは、当初、正常で関節炎を発症していないと思われ、上記の結果から、自己免疫性関節炎を自然発症させる遺伝子は常染色体優性遺伝を示すものと考えられた。しかし、その後の実験で、上記正常と思われたBALB/cマウスは、大関節(例えば手関節、足関節)に腫張はないが、長期間(6カ月以上)詳細に観察すると、指の小関節には程度の差はあれ、関節腫張がみられることが判明した。また交配結果についても、大関節の関節炎発症率は上記の通りであるが、小関節の腫張を入れれば100%に近いことが判明した。これらの結果を勘案すると、この関節炎の遺伝形式は不完全優性あるいは劣性遺伝と考えられた。その後のより詳細な遺伝実験の結果、自己免疫性関節炎を自然発症させる遺伝子は常染色体劣性と考えるのが妥当である。SKGマウスは現在、ホモ接合体として維持されている。その関節炎発症頻度はほぼ100%であり、ホモ接合体における遺伝的浸透度はほぼ100%と考えられる。

〔実施例2〕

関節炎を発症したマウス(6カ月齢)の前肢及び後肢を肉眼で観察した。前肢の写真を図1に、後肢の写真を図3にそれぞれ示す。また、対照として正常マウスの前肢及び後肢の写真を図2及び図4に示す。

図1及び図3が示すように、関節炎を発症したマウスの前肢及び後肢の関節には腫張がみられる。

〔実施例3〕

関節炎を発症したマウス(6カ月齢)の前肢及び後肢のレントゲン写真を撮影した。前肢の写真を図5に、後肢の写真を図7にそれぞれ示す。また、対照として正常マウスの前肢及び後肢の写真を図6及び図8に示す。

図5及び図7が示すように、関節炎による関節の破壊は、前肢及び後肢の大小の関節に対称的に生じている。

## 〔 実施例 4 〕

関節炎を発症したマウス（ 5 ヶ月齢 ）の後肢部分の関節を 1 0 %ホルマリンで 3 日間固定後、パラフィンに包埋し、これより作製した薄切切片をヘマトキシリンエオジンで染色した。また、正常マウスからも同様の切片を作製し、染色した。

関節炎を発症したマウスの関節組織切片の顕微鏡写真を図 9（倍率 × 4 0）及び図 1 1（倍率 × 4 0 0）に、正常マウスの同切片の顕微鏡写真を図 1 0（倍率 × 4 0）及び図 1 2（倍率 × 4 0 0）に示す。

図 9 には、関節腔の消失、軟骨組織および骨組織の破壊、炎症性細胞の浸潤がみられる。また、更に倍率を上げた図 1 1 には、パックスの増生と炎症性細胞の浸潤、関節軟骨の破壊がみられる。

## 〔 実施例 5 〕

関節炎を発症したマウスおよび正常マウス（ 5 ~ 6 カ月齢 ）の後肢の関節の厚さを測定した。関節炎を発症したマウスおよび正常マウスのそれぞれについて 1 5 個体ずつ測定に供した。この結果を図 1 3 に示す。

図 1 3 が示すように、関節炎を発症したマウスは、正常マウスに比べ、後肢足関節の径が増大しており、関節炎による腫張が生じていることがわかる。

## 〔 実施例 6 〕

関節炎を発症したマウスおよび正常マウス（ 5 ~ 6 カ月齢 ）のマウス免疫グロブリン G（ I g G ）に対する I g M 型抗体（リウマチ因子）の力価を E L I S A 法で測定した。関節炎を発症したマウスおよび正常マウスのそれぞれについて 1 5 個体ずつ測定に供した。この結果を図 1 4 に示す。

図 1 4 が示すように、関節炎を発症したマウスは、正常マウスに比べ、有意にリウマチ因子の力価が上昇している。

## 〔 実施例 7 〕

関節炎を発症したマウス及び正常マウス（ 5 ~ 6 カ月齢 ）の牛 II 型コラーゲンに対する血中抗体の力価を E L I S A 法で測定した。関節炎を発症したマウスおよび正常マウスのそれぞれについて 1 5 個体ずつ測定に供した。この結果を図 1

5 に示す。

図 1 5 が示すように、関節炎を発症マウスでは、高力価の自己抗体が出現している。

〔実施例 8〕

関節炎を発症したマウス及び正常マウス（5～6カ月齢）の血清 I g G 濃度を S R I D（Single radial immunodiffusion）法で測定した。関節炎を発症したマウスおよび正常マウスのそれぞれについて 1 5 個体ずつ測定に供した。この結果を図 1 6 に示す。

図 1 6 が示すように、関節炎を発症したマウスでは、高ガンマグロブリン血症がみられる。

〔実施例 9〕

関節炎を発症したマウスより脾臓およびリンパ節細胞の浮遊液を調整し、試験管内でコンカナバリン A 存在下で 3 日間培養し、得られた活性化 T 細胞  $3 \times 10^7$  個を正常 BALB/cヌードマウス（6週齢）に経静脈的に移入した。細胞移入したヌードマウス全個体（7個体）に、移入後 2 カ月で下肢関節の膨張がみられた。3 カ月後に実施例 4 と同様に病理組織標本を作製したところ、図 9 及び図 1 1 と類似した組織像がみられた。

#### 発明の効果

本発明は、ヒトのリウマチ性関節炎に酷似した病態を自然発症するマウスを提供する。このマウスは、該疾患のモデルマウスとして有用である。

#### 図面の簡単な説明

図 1：関節炎を発症したマウスの前肢の写真である。

図 2：正常マウスの前肢の写真である。

図 3：関節炎を発症したマウスの後肢の写真である。

図 4：正常マウスの後肢の写真である。

図 5：関節炎を発症したマウスの前肢のレントゲン写真である。

図 6：正常マウスの前肢のレントゲン写真である。

図 7：関節炎を発症したマウスの後肢のレントゲン写真である。



図 8 : 正常マウスの後肢のレントゲン写真である。

図 9 : 関節炎を発症したマウスから作製した関節組織切片の顕微鏡写真 ( 倍率  $\times 40$  ) である。

図 10 : 正常マウスから作製した関節組織切片の顕微鏡写真 ( 倍率  $\times 40$  ) である。

図 11 : 関節炎を発症したマウスから作製した関節組織切片の顕微鏡写真 ( 倍率  $\times 400$  ) である。

図 12 : 正常マウスから作製した関節組織切片の顕微鏡写真 ( 倍率  $\times 400$  ) である。

図 13 : 関節炎を発症したマウスの後肢足関節の厚さを示す図である。

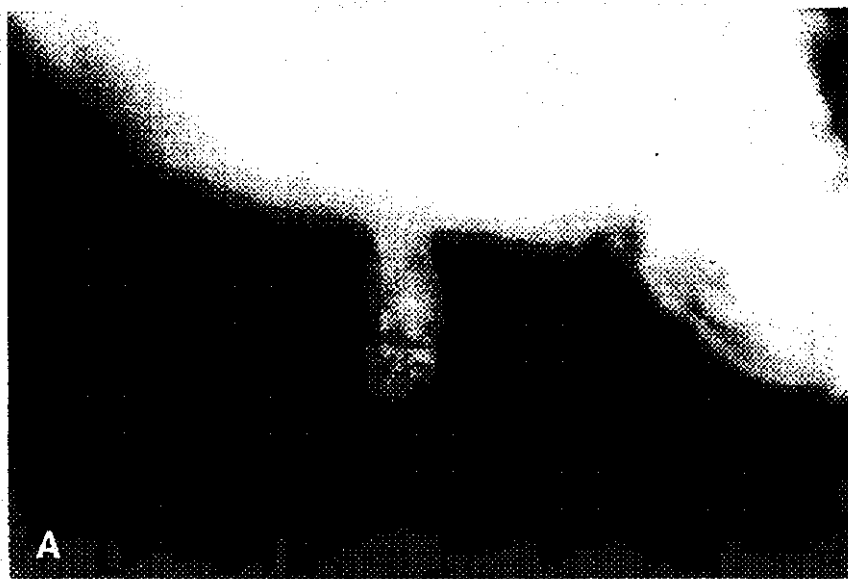
図 14 : 関節炎を発症したマウスのリウマチ因子の力価を示す図である。

図 15 : 関節炎を発症したマウスの自己抗体の力価を示す図である。

図 16 : 関節炎を発症したマウスの血清 I g G 濃度を示す図である。

【 図 1 】

図 1



【 2 】

2



【 3 】

3



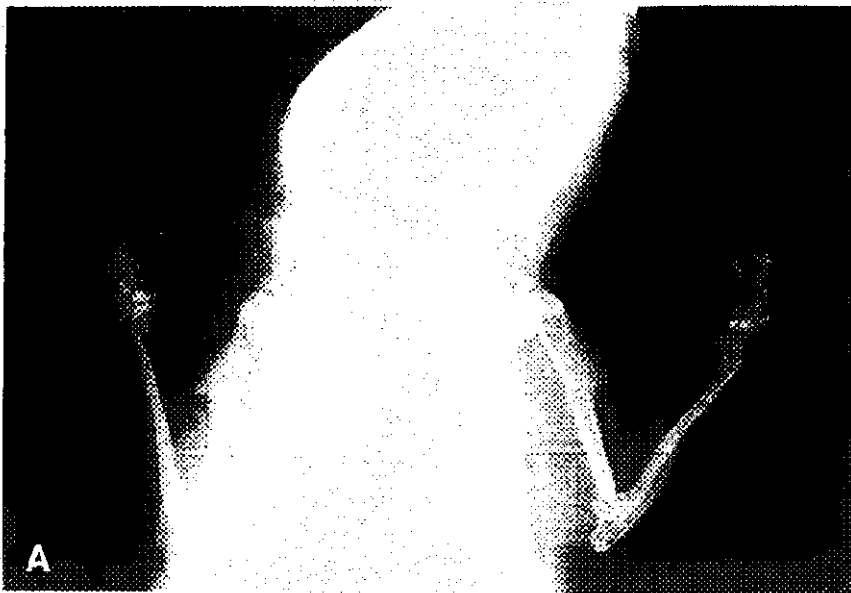
【 4 】

4



【 5 】

5



【 图 6 】

图 6



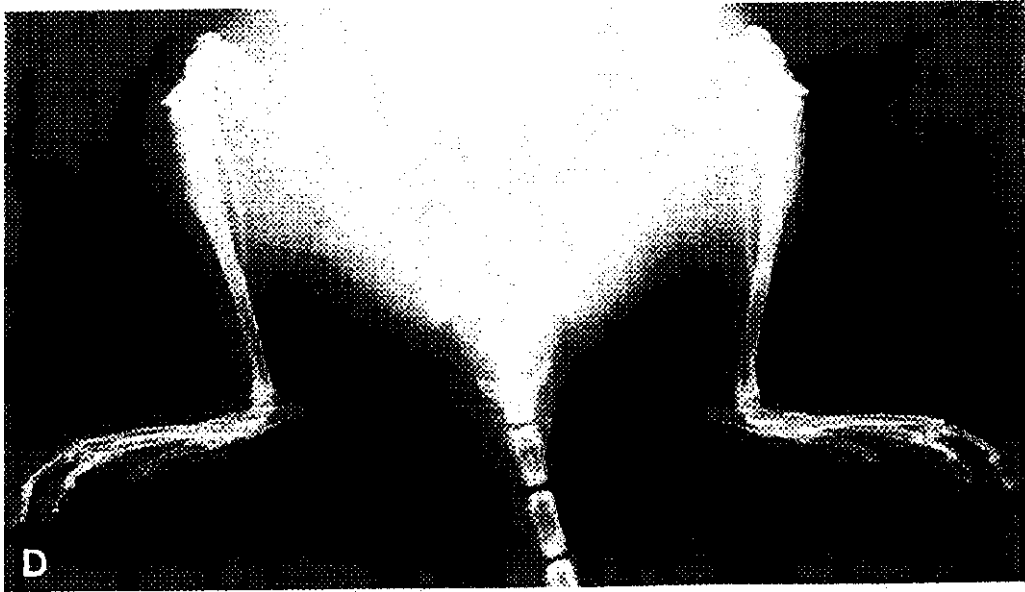
【 图 7 】

图 7



【 图 8 】

图 8



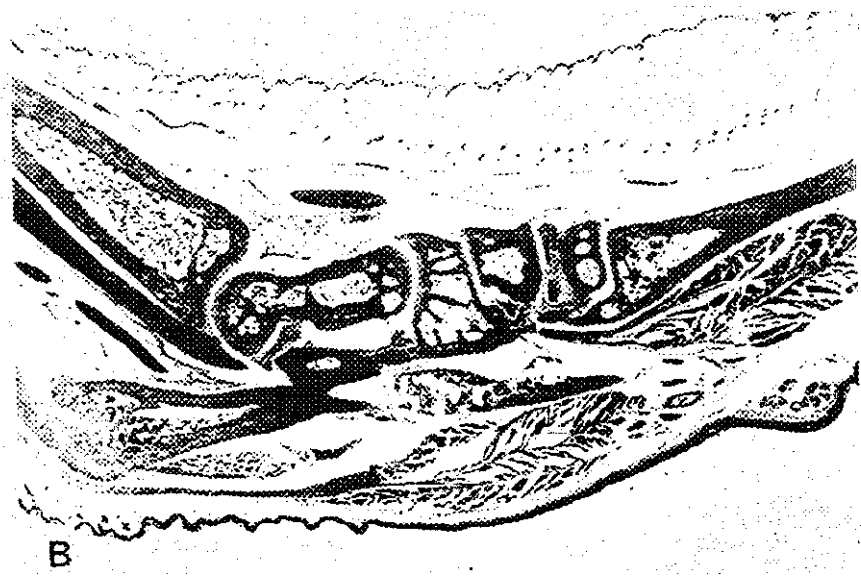
【 图 9 】

图 9



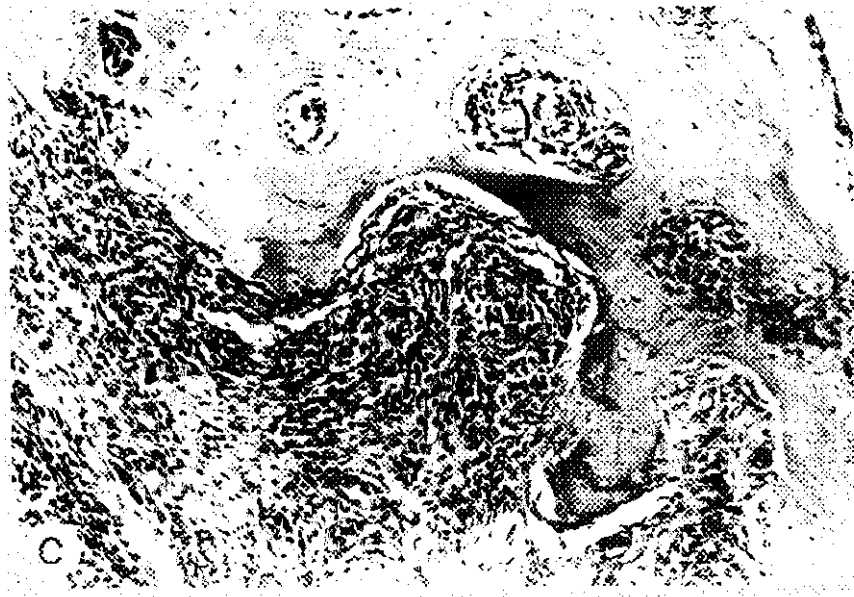
【 10 】

10



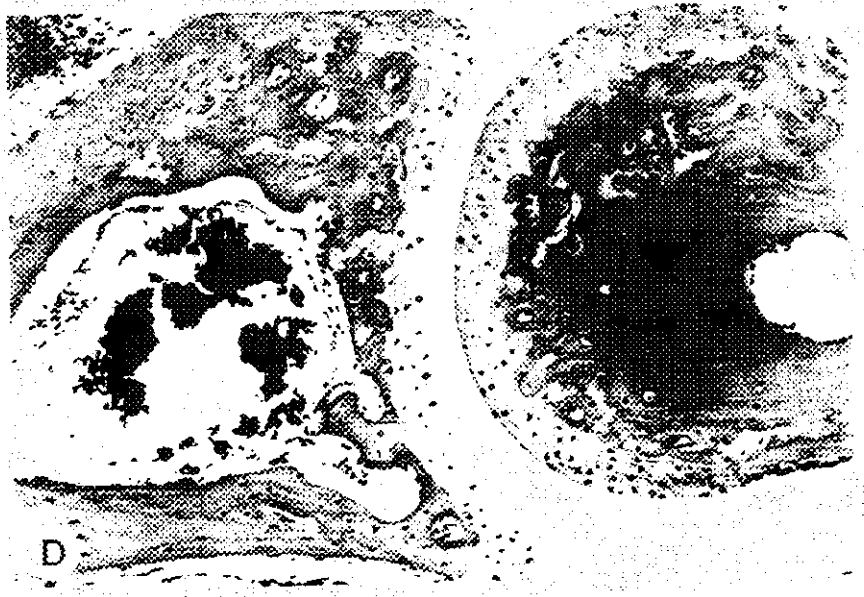
【 11 】

11



【 12 】

12



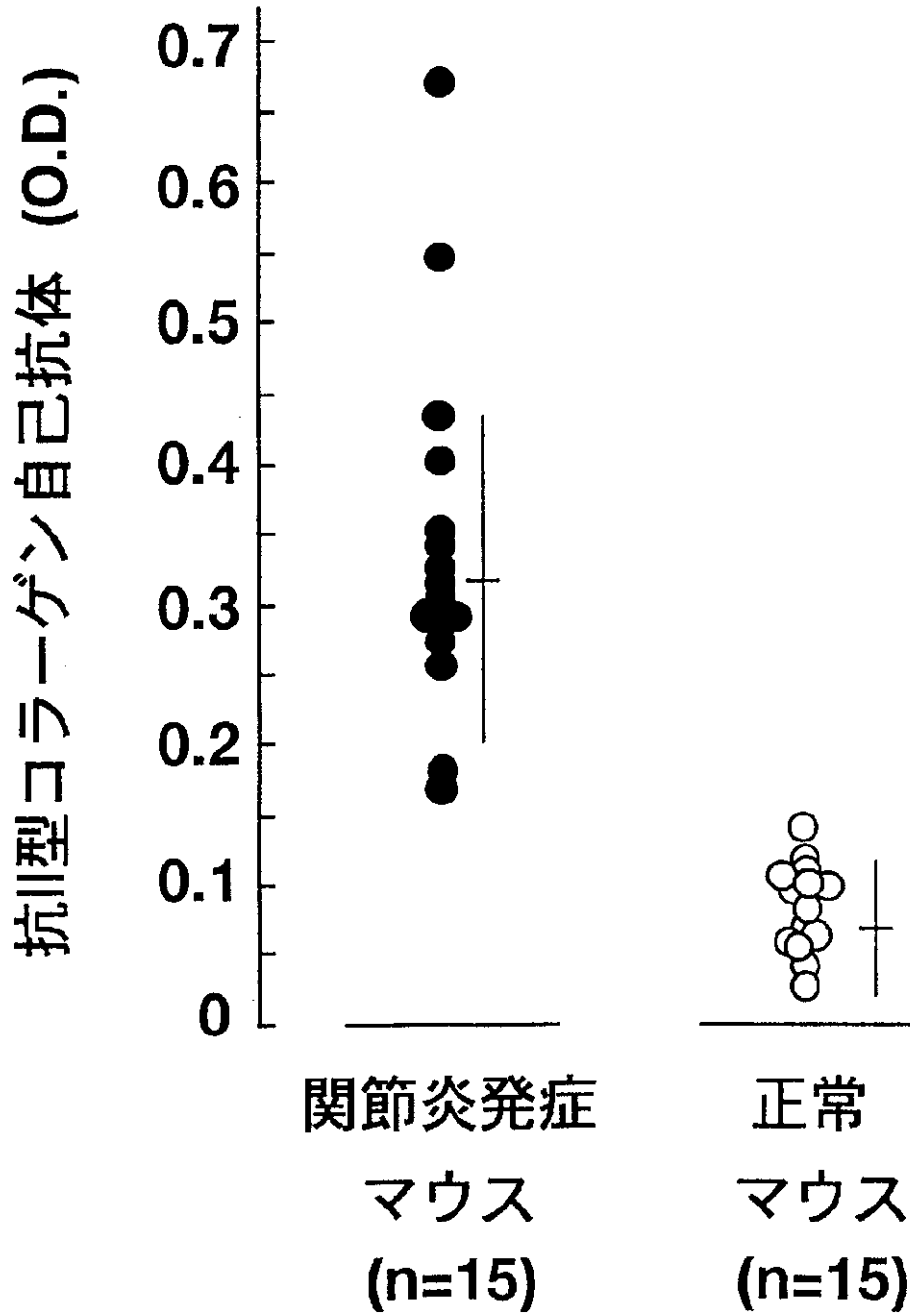






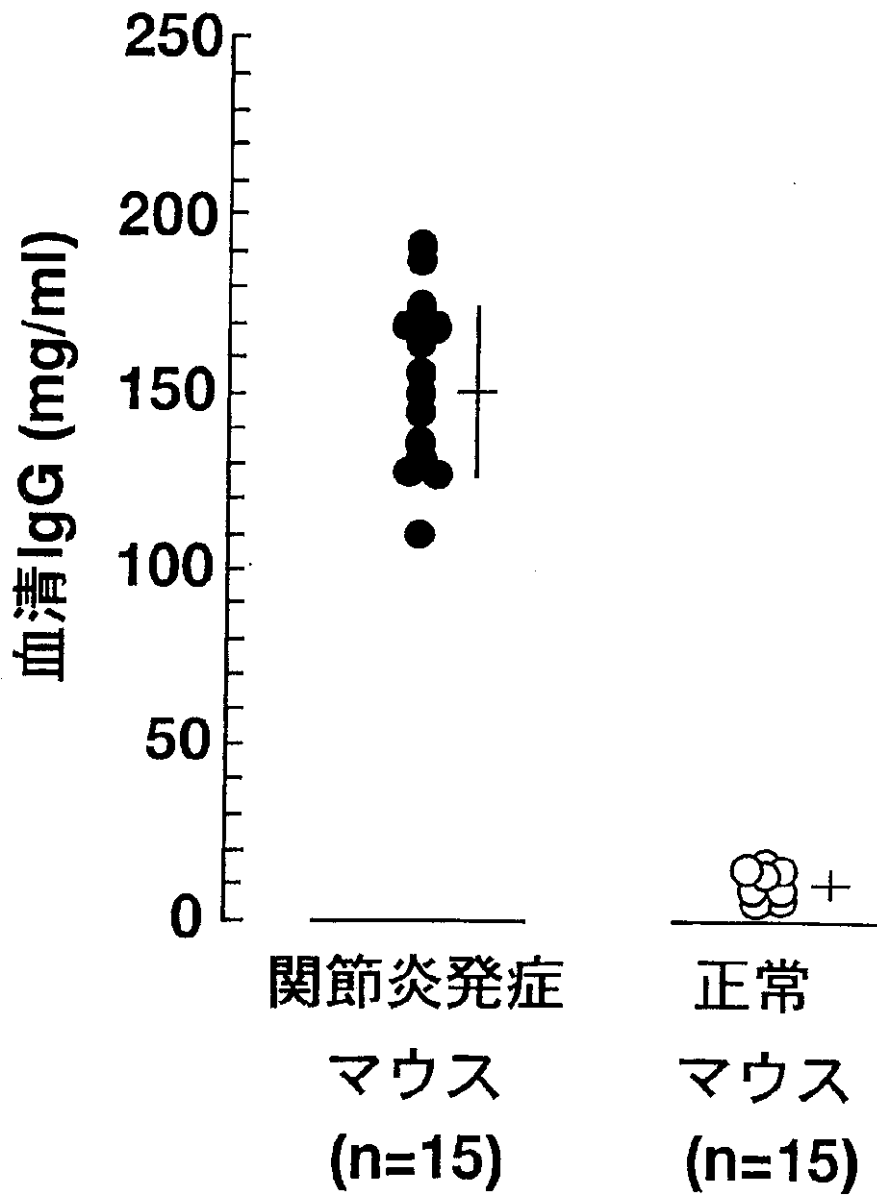
【 図 15 】

図 15



【 図 16 】

図 16



## 【 国際調査報告 】

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 97/03591
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>8</sup> A 01 K 67 / 027		
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 <sup>8</sup> A 01 K 67 / 027		
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		
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 PREVIEWS		
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
Y	Hang L. et al, J. Exp. Med., vol.155, p.1690-1701 (1982)	1
Y	Bouvet J-P. et al, Arthritis Rheum., vol.33, p.1716-1722 (1990)	1
Y	Nordling C. et al, Arthritis Rheum., vol.35, p.717-722 (1992)	1
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、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 19. 12. 97		国際調査報告の発送日 07.01.98
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 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) 坂田 誠 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3238

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。