

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/199144

発行日 平成29年8月10日 (2017. 8. 10)

(43) 国際公開日 平成27年12月30日 (2015. 12. 30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO1K 67/027 (2006.01)	AO1K 67/027 ZNA	2GO45
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 35 頁)

出願番号 特願2016-529636 (P2016-529636)	(71) 出願人 304026696 国立大学法人三重大学 三重県津市栗真町屋町1577
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/068238	
(22) 国際出願日 平成27年6月24日 (2015. 6. 24)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-130304 (P2014-130304)	(74) 代理人 100108280 弁理士 小林 洋平
(32) 優先日 平成26年6月25日 (2014. 6. 25)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 矢野 裕 日本国三重県津市江戸橋2丁目174番地 三重大学医学部附属病院内
	(72) 発明者 ガバザ エステバン セサル 日本国三重県津市江戸橋2丁目174番地 三重大学医学部附属病院内
	(72) 発明者 ガバザ コリナ 日本国三重県津市江戸橋2丁目174番地 三重大学医学部附属病院内

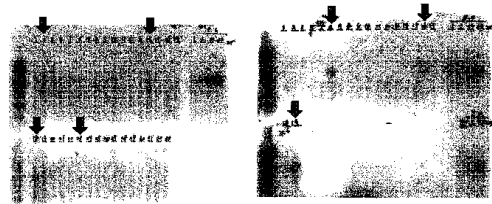
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎特異的にヒトTGFβ1を発現するトランスジェニックマウス、及び組織線維症マウスモデル用のバイオマーカー

(57) 【要約】

【課題】 腎特異的にTGFβ1を発現し、自然発症的に腎線維症を発症するTGマウスを提供すること。マウスPodocinのプロモーター領域と、その下流に配置されて発現を制御されるヒト形質転換因子1(ヒトTGFβ1)の全遺伝子領域とを含むことを特徴とするトランスジェニックマウスによって達成される。このとき、トランスジェニックマウスは、生後15週齢から自然的に腎線維症・腎不全を発症し、生後20週～26週で死亡し始めることが好ましい。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

非ヒト哺乳類のPodocinのプロモーター領域と、その下流に配置されて発現を制御されるヒト形質転換因子 1 (ヒトTGF 1) の全遺伝子領域とを含む非ヒト・トランスジェニック哺乳類。

【請求項 2】

前記非ヒト哺乳類は、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、ウマ、ウシからなる群から選択される少なくとも一つである請求項 1 に記載の非ヒト・トランスジェニック哺乳類。

【請求項 3】

前記ヒトTGF 1は、非活性型TGF 1として腎臓で発現されて、細胞外で活性型TGF 1となる請求項 1 または 2 に記載の非ヒト・トランスジェニック哺乳類。

10

【請求項 4】

前記ヒトTGF 1の全遺伝子領域は、7個のエキソンと6個のイントロンを含む請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の非ヒト・トランスジェニック哺乳類。

【請求項 5】

前記非ヒト哺乳類がマウスであり、このトランスジェニックマウスは、生後15週齢から自然的に腎線維症を発症し始めることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一つに記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 6】

上記トランスジェニックマウスの系統は、C57BL/6Jであることを特徴とする請求項 5 に記載のトランスジェニックマウス。

20

【請求項 7】

(1)ヒトTGF 1遺伝子を含むBACにおいて、ヒトTGF 1遺伝子のイントロン部分に選択用カセットを組み込み、選択用遺伝子導入ヒトTGF 1遺伝子を得る選択用遺伝子組換え工程、(2)前記選択用遺伝子導入ヒトTGF 1遺伝子の5'-側及び3'-側に、マウスPodocinプロモーターの下流の配列に相同的な配列を導入して、修飾ヒトTGF 1遺伝子フラグメントとする修飾工程、(3)5'-側及び3'-側にランキング配列を有するマウスPodocin全コード配列を含むBACにおいて、前記修飾ヒトTGF 1遺伝子フラグメントを、前記マウスPodocinプロモーター領域の下流側に転移させて、Podocin選択用ヒトTGF 1遺伝子フラグメントとする工程、(4)前記選択用ヒトTGF 1遺伝子フラグメントを取り除いて、Podocin-TGF 1 BACトランスジェニック構築物を得る工程、(5)前記Podocin-TGF 1 BACトランスジェニック構築物からPodocin-TGF 1遺伝子を精製し、マウス胚にマイクロインジェクションして、トランスジェニックマウスを得る工程を備えることを特徴とする請求項 3 または 4 に記載のトランスジェニックマウスの作成方法。

30

【請求項 8】

前記修飾ヒトTGF 1遺伝子フラグメントを作成する際に用いられるPCR反作用の一对のプライマーの塩基数は、50塩基~60塩基であることを特徴とする請求項 7 に記載のトランスジェニックマウスの作成方法。

【請求項 9】

(1)ヒトTGF 1を発現するトランスジェニックマウスにおいて、体液中ヒトTGF 1濃度とCT線維症スコアとの相関関係を示すグラフから前記トランスジェニックマウスが線維症を発症する所定の体液中ヒトTGF 1濃度であるカットオフ値を求める工程、(2)前記トランスジェニックマウスから体液を採取した後に、体液中ヒトTGF 1濃度を測定する工程、(3)前記カットオフ値と測定された体液中ヒトTGF 1濃度とを比較し、体液中ヒトTGF 1濃度が前記カットオフ値以上の場合に、前記トランスジェニックマウスが線維症を発症していると判断するヒトTGF 1発現トランスジェニックマウスの病態評価方法。

40

【請求項 10】

請求項 7 に記載のヒトTGF 1発現トランスジェニックマウスの病態評価方法を実施するためのキットであって、前記トランスジェニックマウスから体液を採取するための機具と、採取した体液からヒトTGF 1を含む成分を分離するためのチューブと、ヒトTGF 1濃度を

50

測定するためのELISAとを備えたことを特徴とするキット。

【請求項 1 1】

ヒトの線維症を診断するキットであって、被験者から体液を採取するための機具と、採取した体液からヒトTGF 1を含む成分を分離するためのチューブと、ヒトTGF 1を測定するためのELISAとを備えたことを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腎特異的にヒトTGF 1 (human transforming growth factor 1; 形質転換 (トランスフォーミング) 成長 (増殖) 因子ベータ1; 以下、「ヒトTGF 1」または「hTGF 1」という) を発現するトランスジェニック (TG) マウス、及び組織線維症マウスモデル用のバイオマーカーに関する。

【背景技術】

【0002】

糖尿病、膠原病、高血圧等の慢性疾患による腎症の悪化に伴い、血液透析を行う患者数が増加している。年間約1万人以上の患者が新たに透析を開始している。慢性疾患から腎不全に移行した血液透析患者の予後は、他疾患に比較して著しく悪いので、予後改善の対策が急務である。病気の初期段階では、炎症反応は腎障害の病態形成に重要な役割を果たす。病態が進行すると、異常な上皮及び間葉組織の反応によって線維化が起こる。組織の線維化の原因として、TGF 1、結合組織成長因子 (connective tissue growth factor (CTGF))、血小板成長因子 (platelet-derived growth factor (PDGF))、炎症性サイトカイン、ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド2/単球走化性タンパク質 1 (CCL2)、酸化剤、凝固因子を含む多くの因子が考えられている。

TGF 1は、腎臓を含め色々な臓器での線維症及び組織修復を含めたりモデリングの発症機序における主要なサイトカインである。マクロファージ、T細胞、好酸球、好中球、好塩基球を含む多くの細胞はTGF 1を産生する。TGF 1は、細胞内において、関連タンパク質 (latency-associated protein (LAP)) に結合した非活性な形で保存される。この非活性型TGF 1が、線維化の過程において共通して増加するカテプシン、プラスミン、カルパイン、トロンボスパンジン、インテグリン - v 6、メタロプロテイナーゼなどによってLAPから切り離されることで、活性型TGF 1が放出される。遺伝子組み換え動物を用いた実験によれば、血液中の活性型TGF 1濃度が上昇すると、単核球浸潤に伴う腎臓の線維化が誘導される。腎臓の線維症にはTGF 1が重要な役割を担っていると考えられる。一方、重篤な腎線維症患者の血液、尿、腎組織には、活性型及び潜在型TGF 1が高濃度に観察されている。

【0003】

ヒトの臓器線維症に関する研究や臓器線維症に関する医薬品開発のために、臓器特異的にヒトTGF 1を発現するモデル動物 (例えば、マウスなど) の作成が求められている。本発明者は、長年に渡ってヒトTGF 1の研究に取り組んでおり、肺特異的にヒトTGF 1を発現するトランスジェニック (TG) マウスの開発に成功した (特許文献 1)。

しかし、腎組織で特異的にヒトTGF 1を発現するTGマウスの報告は認められない。このため、腎組織を含む他の臓器でもヒトTGF 1を発現するTGマウスを用いて、腎線維症の研究を行わざるを得ない状況が続いている (非特許文献 1)。

一方、組織線維症マウスモデル用のバイオマーカーが知られているが (非特許文献 2)、このバイオマーカーは線維化の過程に伴う炎症の程度を示すだけであり、組織線維症の特異的なバイオマーカーではない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2013 - 094071 号公報

【非特許文献】

【 0 0 0 5 】

【非特許文献1】Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Boettinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS: Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-1 develop progressive renal disease. Lab Invest 1996;74: 991-1003.

【非特許文献2】Bleomycin induces strain-dependent alterations in the pattern of epithelial cell-specific marker expression in mouse lung. Toxicol Appl Pharmacol. 1997 Feb;142(2):303-10.

【非特許文献3】Zhang Y et al, A new logic for DNA engineering using recombination in E.Coli., Nature 20(1998) 123-128

【非特許文献4】Exp Anim. 2004 53(4):311-20. Establishment of an efficient BAC transgenesis protocol and its application to functional characterization of the mouse Brachyury locus. Abe K, Hazama M, Katoh H, Yamamura K, Suzuki M. 10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

腎線維症のモデルマウスとして、腎特異的にTGF 1を発現するマウスが望まれている。現在までのところ、そのようなTGマウスは得られていなかった。

モデルマウスの病態を評価するための組織線維症の特異的なバイオマーカーは、知られていなかった。

本発明は、上記した事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、腎特異的にTGF 1を発現し、自然発症的に腎線維症を発症するTGマウスを提供することである。また、別の目的は、組織線維症マウスの病態を評価するためのバイオマーカーを提供することである。 20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

上記目的を達成するための発明に係る非ヒト・トランスジェニック哺乳類は、当該哺乳類のPodocinのプロモーター領域と、その下流に配置されて発現を制御されるヒト形質転換因子 1 (ヒトTGF 1) の全遺伝子領域とを含むことを特徴とする。このとき、このトランスジェニック非ヒト哺乳類は、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、ウマ、ウシからなる群から選択されることが好ましく、マウスであることがより好ましい。 30

前記ヒトTGF 1は、非活性型TGF 1として腎臓で発現されて、細胞外で活性型TGF 1となることが好ましい。

前記ヒトTGF 1の全遺伝子領域は、7個のエキソンと6個のイントロンを含むことが好ましい。

【 0 0 0 8 】

マウスPodocin遺伝子のコード領域は、17 kbにわたるゲノム配列に8個のエキソンと7個のイントロンを含んでコードしている。ヒトTGF 1遺伝子のコード領域は、23 kbにわたるゲノム配列に7個のエキソンと6個のイントロンを含んでコードしている。本発明では、マウスPodocinのプロモータを用い、Podocin遺伝子のコード領域に代えて、ヒトTGF 1遺伝子の全コード領域を組み込んだものを用いる。TGF 1は、細胞内において、関連タンパク質(LAP)と結合した非活性型として保存されている。非活性型TGF 1は、細胞外で各種因子(カテプシン、プラスミン、カルパイン、トロンボスパンジン、インテグリン-v 6、メタロプロテイナーゼなど)によってLAPから切断されて、活性型TGF 1となる。TGF 1として、イントロンを含む全遺伝子領域ではなく、mRNAから調製されたcDNAを用いてトランスジェニックマウスを作製しようとする、非活性型TGF 1を経由することなく、活性型TGF 1が大量に発現してしまうため、腎特異的TGF 1発現トランスジェニックマウスを作製できなかった。これに対し、本願発明では、イントロンを含む全遺伝子領域を用いるため、天然のTGF 1の発現形態に近いものとなる。このため、病態の解析にも、より有用なトランスジェニックマウスとなる。 40

非ヒト哺乳類がマウスのときには、トランスジェニックマウスは、生後15週齢から自然 50

的に腎線維症・腎不全を発症し始めることが好ましい。

上記トランスジェニックマウスの系統は、C57BL/6Jであることが好ましい。

【0009】

上記トランスジェニックマウスの作成方法は、(1)ヒトTGF β 1遺伝子を含むBacterial Artificial Chromosome (BAC)において、ヒトTGF β 1遺伝子のイントロン部分に選択用カセットを組み込み、選択用遺伝子導入ヒトTGF β 1遺伝子を得る選択用遺伝子組換え工程、(2)前記選択用遺伝子導入ヒトTGF β 1遺伝子の5'-側及び3'-側に、マウスPodocinプロモーターの下流の配列に相同的な配列を導入して、修飾ヒトTGF β 1遺伝子フラグメントとする修飾工程、(3)5'-側及び3'-側にフランキング配列を有するマウスPodocin全コード配列を含むBACにおいて、前記修飾ヒトTGF β 1遺伝子フラグメントを、前記マウスPodocinプロモーター領域の下流側に転移させて、Podocin選択用ヒトTGF β 1遺伝子フラグメントとする工程、(4)前記選択用ヒトTGF β 1遺伝子フラグメントを取り除いて、Podocin-TGF β 1 BACトランスジェニック構築物を得る工程、(5)前記Podocin-TGF β 1 BACトランスジェニック構築物からPodocin-TGF β 1遺伝子を精製し、マウス胚にマイクロインジェクションして、トランスジェニックマウスを得る工程を備えることを特徴とする。

上記発明において、選択用遺伝子は、ストレプトマイシン感受性の野生型リボソーマルS12タンパクコード遺伝子(rpsL)であることが好ましい。

上記発明において、マウスPodocin全コード配列の5'側及び3'側に配置されるフランキング配列とは、マウスPodocin全コード配列(遺伝子)の5'側及び3'側に存在する配列であり、Podocinの発現に影響を与え得る配列を意味する。

【0010】

本発明に係るヒトTGF β 1発現トランスジェニックマウスの病態評価方法は、(1)体液中ヒトTGF β 1濃度とCT線維症スコアとの相関関係を示すグラフからトランスジェニックマウスが線維症を発症する所定の体液中ヒトTGF β 1濃度であるカットオフ値を求める工程、(2)前記トランスジェニックマウスから体液を採取した後に、体液中ヒトTGF β 1濃度を測定する工程、(3)前記カットオフ値と測定された体液中ヒトTGF β 1濃度とを比較し、体液中ヒトTGF β 1濃度がカットオフ値以上の場合に、前記トランスジェニックマウスが線維症を発症していると判断することを特徴とする。

また、上記病態評価方法を実施するためのキットは、トランスジェニックマウスから体液を採取するための機具と、採取した体液からヒトTGF β 1を含む成分を分離するためのチューブと、ヒトTGF β 1濃度を測定するためのELISAとを備えたことを特徴とする。所定の体液中ヒトTGF β 1濃度であるカットオフ値は、発症を認める最低の濃度であっても良く、最低値に10%程度上乘せし一定のマージンを見込んだ濃度値であっても良い。一定の区分を設け、症状を推定する様に複数のカットレベルを設定することも出来る。

さらに、ヒトの線維症を診断するためのキットは、被験者から体液を採取するための機具と、採取した体液からヒトTGF β 1を含む成分を分離するためのチューブと、ヒトTGF β 1を測定するためのELISAとを備えたことを特徴とする。

本発明において、体液とは、血液、尿、唾液、涙の他、鼻水、汗、胃液等の分泌液、胸腹水等の貯留液等をいう(以下同様。)

【0011】

本発明において、機具とは、体液が血液の場合には注射器を、尿の場合には導尿管・尿回収盆などを、唾液の場合には適当な大きさのカップ・唾液採取管などを、涙・鼻水・汗の場合にはスパチュラのような小さなスプーン型機具・スポイトなどを、胃液の場合には胃管を、胸腹水の場合には固定管・注射器などをそれぞれ意味する。

本発明において、ヒトTGF β 1を含む成分とは、主として細胞外の液体成分を意味する。例えば、血液の場合には血清・血漿を意味する。その他の体液の場合には、そのまま、或いは適当に遠心分離等で固液分離を行った後に、液体部分を測定用の液体成分として取り扱う。

腎臓の糸球体には、内皮細胞、基底膜、足細胞(podocyte)を備えた濾過膜が形成されている。このうち、足細胞は糸球体基底膜の反対側に沿って並んでおり、ボーマン嚢の裏

10

20

30

40

50

の部分に存在する。足細胞は、糸球体からのタンパク質の濾過を抑制するため、多くの偽足がかたく絡み合って網状組織を構成している。Podocin (ポドシン) は、隣接した足細胞の突起の間のスペースに特異的に発現するタンパク質である。本発明において、腎特異的にヒトTGF β 1を発現させるためのプロモーターとして、Podocinのプロモーターを用いる。腎特異的に発現するタンパク質としては、Podocinの他に、ネフリン (nephrin)、Glucocorticoid Induced Transcript-1 (GLCCT1) などが知られている。本発明の技術的思想によれば、Podocin以外にも腎特異的に発現するタンパク質のプロモーターを用いることができる。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、腎特異的にヒトTGF β 1を発現し、自然発症的に腎線維症を発症するTGマウスを提供できる。このTGマウスを用いることにより、腎関連疾患 (糸球体硬化症、腎不全、糖尿病性腎障害、高血圧関連腎障害、腎がん、腹膜線維症などを含む) に関する研究を飛躍的に発展させられる。

また、本発明によれば、ヒトTGF β 1を発現するトランスジェニックマウスの病態をCT検査することなく簡易に評価できる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】ヒトTGF β 1遺伝子及びマウスPodocin遺伝子の情報とゲノムクローンの探索方法を説明する図である。

【図2】マウスPodocin遺伝子及びヒトTGF β 1遺伝子の組換えBACクローンの構築方法を説明する図である。

【図3】Red/ET反応で接合したH1~H6のゲノムDNA配列を確認した結果を示す図である。

【図4】マウスPodocin_ヒトTGF β 1 RecBAC発現コンストラクトの精製結果を示す図である。(A)PI-SceIで直鎖化した発現コンストラクトをパルスフィールド電気泳動装置で分離した。ガイドマーカーとしてゲルの両端にアプライしたサンプルのみを可視化し、アガロースゲル中に分離した発現コンストラクトを含むゲルをUV照射することなく切り出したときのゲル写真図、(B)電気溶出、透析により精製したDNA断片をパルスフィールド電気泳動にアプライし、長鎖DNA断片が分断せずに精製されていることを確認したときのゲル写真図、(C)NanoDrop分光光度計によりDNA濃度を決定した結果を示すグラフである。図中のマーカーは、M1: NEB Low Range PFG markerである。

【図5】サザンハイブリダイゼーションによるPodocinヒトTGF β 1 RecBACトランスジェニックマウス・ファウンダー個体の同定を行った結果を示すゲル写真図である。ランダムプライム法により [32P]ラベル化されたPodocin_ヒトTGF β 1 RecBACをトランスジェニックマウス・ファウンダー候補個体のゲノムDNAの断片がトランスファーされたサザンプロットとともにインキュベートしてハイブリダイズさせた。ナイロンメンブレンを洗浄して非特異的に結合した放射性プローブを除去し、特異的に結合する断片をオートラジオグラフィで検出した。図中のマーカーはM1:NEB, 1KB ladderである。

【図6】マウスPodocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスにおけるマウスとヒトTGF β 1のreverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)を行った結果を示す写真図である。マウスTGF β 1の発現は殆どすべての臓器に認められた。一方、ヒトTGF β 1の発現は腎臓のみに認められた。

【図7】野生型マウスとマウスpodocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスの腎臓組織所見 (Hematoxylin-Eosin染色) を示す顕微鏡写真図である。野生型マウスの糸球体 (A,B) は正常所見を示す。Podocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスは糸球体の委縮 (C,D)、糸球体線維症 (E)、腎間質の線維症 (F) が認められた。

【図8】野生型マウスとマウスpodocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスの腎臓でのコラーゲン沈着 (マッソントリクローム染色) を示す顕微鏡写真図である。野生型マウス (A,B,C) の腎組織のコラーゲン沈着は正常範囲であるが、マウスPodocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウス (D,E,F) の腎組織のコラーゲン沈着は高度である。

10

20

30

40

50

【図9】16週齢めのマウスPodocin-ヒト/TGF β 1 RecBAC-TGマウスと、野生型マウスの血漿中BUN (A) 及びクレアチニン (creatinine) (B) を測定した結果を示すグラフである。マウスPodocin-ヒト/TGF β 1 RecBAC-TGマウスでは、いずれの血漿中濃度も上昇していた。

【図10】野生型マウス (WT) 及びマウスPodocin-ヒト/TGF β 1 RecBAC-TGマウス (TGF β 1 TG) にストレプトゾトシン (STZ) を投与したときの血糖値の変化を確認した結果を示すグラフである。

【図11】ブドウ糖負荷試験の結果を示すグラフである。

【図12】ストレプトゾトシン (STZ) 投与前後のマウスPodocin-ヒト/TGF β 1 RecBAC-TGマウスの腎臓を調べたときのCT写真図 (A) 及び試験前後の腎臓サイズを比較したグラフ (B) である。 10

【図13】腎組織の顕微鏡写真図である。A: 野生型マウスに食塩水を投与した群、B: 野生型マウスにSTZを投与した群、C: マウスPodocin-ヒト/TGF β 1 RecBAC-TGマウス (TGF β 1 TGマウス) にSTZを投与した群のものをそれぞれ示す。

【図14】各群のマウスについて、ホメオスタシス・モデル・アセスメント (homeostasis model assessment: HOMA-IR) を求めた結果を示す棒グラフである。グラフ中、「WT/SAL」は野生型マウス/生理食塩水投与群、「Podocin-TGF β 1-TG/SAL」はトランスジェニックマウス/生理食塩水投与群、「WT/STZ」は野生型マウス/STZ投与群、「Podocin-TGF β 1-TG/STZ」はトランスジェニックマウス/STZ投与群をそれぞれ示す。

【図15】マウスPodocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスにおけるTGF β 1濃度を測定した結果を示すグラフである。Podocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスでは、野生型マウスに比べ、血漿中(A) 及び尿中(B) のヒトTGF β 1濃度は高値であった。 20

【図16】マウスSurfactant protein C ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスにおいて、血漿中TGF β 1濃度を測定した結果を示すグラフである。マウスSurfactant protein C-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスでは、野生型マウスに比べ、血漿中ヒトTGF β 1濃度は有意に高値であった。

【図17】Surfactant protein C (SPC) ヒトTGF β 1 RecBAC TGマウスの週齢と血漿中のTGF β 1の濃度との関連性を調べた結果を示すグラフである。10週令以上のマウスでは、血漿中TGF β 1濃度が高く保たれていた。

【図18】Computed tomography(CT)線維症スコアと血漿中TGF β 1濃度との相関関係を示すグラフである。CT肺線維症スコアと血漿中TGF β 1の濃度は有意に正の相関を示した。血漿中TGF β 1濃度が3000pg/ml以上のマウスは、CTスコアが3.5以上であった。カットオフ値を3000pg/mlとして、これ以上の血漿中TGF β 1濃度を示すマウスは、CT所見がなくても肺線維症を発症していることが判断できることが分かった。 30

【図19】肺線維症患者と健常者における血漿中TGF β 1濃度を測定した結果を示すグラフである。(A)には平均値を、(B)には全個体値をそれぞれ示した。(A)肺線維症患者の血漿中TGF β 1濃度は、健常者に比べ、有意に高値であった。(B)血漿中TGF β 1濃度は、肺線維症患者において、高値を示す例及び健常者と変わらず低値を示す例が認められた。

【発明を実施するための形態】

【0014】 40

次に、本発明の実施形態について、図表を参照しつつ説明する。本発明の技術的範囲は、これらの実施形態によって限定されるものではなく、発明の要旨を変更することなく様々な形態で実施できる。

<ヒトTGF β 1-BAC トランスジェニックマウスの作成>

1. ヒトTGF β 1遺伝子及びマウスPodocin遺伝子の情報とゲノムクローンの探索

マウスPodocin遺伝子のcDNA配列、NM_130456をもとにしてマウスゲノムDNA配列を検索したところ、マウスPodocin遺伝子は1番染色体の1領域に存在することがわかった。マウスPodocin遺伝子のcDNA配列とマウスゲノム配列を並べたところ、マウスPodocin遺伝子のコード領域も17 kbにわたるゲノム配列に8個のエキソンでコードしていることが明らかになった。 50

次に、マウスPodocin遺伝子座をコードするBACクローンを探索したところ、RP23-5701に、マウスPodocin遺伝子座のゲノムDNA配列が含まれていることがわかった。このBACクローンにはマウスPodocin遺伝子座とともに、5'上流の69 kbのゲノム配列、及び3'下流の139 kbのゲノム配列を含む、1番染色体の225 kbがカバーされている(図2)。以上の遺伝子情報から、この225 kbのBACクローン、RP23-5701にはPodocin遺伝子をドライブする全ての発現制御配列が含まれていると考えられた。このクローンを利用してヒトTGF β 1遺伝子の発現ベクターを構築することが合理的であると判断した(図1(A))。

【0015】

ヒトTGF β 1遺伝子のcDNA配列、NM_000660をもとにしてヒトゲノムDNA配列を検索したところ、ヒトTGF β 1遺伝子は19番染色体の19q13.1領域に存在することがわかった。ヒトTGF β 1遺伝子のcDNA配列とヒトゲノム配列を比べたところ、ヒトTGF β 1遺伝子のコード領域は23 kbにわたるゲノム配列に7個のエキソンでコードしていることが明らかになった。

次に、ヒトTGF β 1遺伝子座をコードするBACクローンを探索したところ194.7 kbのサイズのRP11-638N16に、ヒトTGF β 1遺伝子座の全てのゲノムDNA配列を含んでいることがわかった(図1(B))。

【0016】

2. マウスPodocin遺伝子及びヒトTGF β 1遺伝子の組換えBACクローンの構築

大腸菌内での能動型相同組み換え反応であるRed/ET Recombination Technology (非特許文献3)を利用して、Podocin遺伝子及びTGF β 1遺伝子を含むBACクローンからPodocin_ヒトTGF β 1 RecBACの組換えBACクローンを構築した。

表1に示したように、ヒトTGF β 1遺伝子のイントロン1の配列、ヒトTGF β 1遺伝子の翻訳開始コドンから停止コドンまでのゲノムDNA配列の両端の配列、及びマウスBACクローンのPodocin遺伝子の翻訳開始コドンから停止コドンまでのゲノムDNA配列の3'側末端、5'側末端を大腸菌内での能動型相同組み換え反応のためのキー配列とした。

【0017】

10

20

【表1】

キー配列	位置	ゲノム配列 (配列番号1~配列番号6)
TGFβ1-H1	ヒトTGFbeta-遺伝子の開始コドン	[5']ATGCCGCCCTCCGGGCTGCGGCTGCTGCCGCTGCT[3']
TGFβ1-H2	ヒトTGFbeta-遺伝子の停止コドン	[5']CAACATGATCGTGGCTCCTGCAAGTGCAGCTGA[3']
TGFβ1-H3	RpsI-kan挿入サイト、5'側	[5']agggcgtaggagaaagtggaccagagcttg[3']
TGFβ1-H4	RpsI-kan挿入サイト、3'側	[5']ccttcttgaatctttccacctcaggacccc [3']
Podocin-H5	マウスPodocin-遺伝子の5'UTR	[5']gctGGGGCTGGCACTCTGCCAGCAGCTGGCTCCGGGGTTGCACCGCTGCATTGAGA[3']
Podocin-H6	マウスPodocin-遺伝子の3'UTR	[5']GCGAATGGGCAAAGGCTGTGTGAATCTGCCATATAAAGCCACATCCCTGAGAGAGG[3']

【0018】

ヒトBACクローンのTGF β 1遺伝子のイントロン1にポジティブ/ネガティブセレクションマーカーカセット (RpsI-kan: 本発明の選択用カセットに該当する) を挿入するために、TGF β 1-H3配列、RpsI-kan、及びTGF β 1-H4配列をタンデムにつないだDNAフラグメントを、LA-Taq (タカラバイオ) を用いたPCRにより構築した (TGF β 1 RpsI-Kanブレイクインフラグメント) (図2A)。Red/ET反応の能力を有した大腸菌株に、TGF β 1遺伝子座を含むヒトBACクローンとTGF β 1 RpsI-Kanブレイクインフラグメントを導入し、この宿主大腸

10

20

30

40

50

菌内でRed/ET反応を誘導し、クロラムフェニコール耐性及びカナマイシン耐性のコロニーをピックアップすることにより、TGF 1 RpsI-kanブレイクインフラグメントをTGF 1遺伝子座のイントロン1に挿入した組み換えBACクローンをスクリーニングした(ヒトTGF 1 Intermediate: 選択用遺伝子組換え工程)(図2A)。

このヒトTGF 1 Intermediate から、RpsI-kanカセットを挿入したヒトTGF 1遺伝子のゲノムDNA配列をプラスミドベクターにサブクローニングするため、H2-H6-SacBp Bluescript-H5-H1をタンデムにつないだDNAカセットを構築した(TGF 1プレトランスファープラスミド)(図2B)。上記と同様の方法で、Red/ET反応の能力を有する大腸菌株に、ヒトTGF 1 Intermediateとともに、直鎖化したTGF 1プレトランスファープラスミドを導入し、この宿主大腸菌内でRed/ET反応を誘導してアンピシリン耐性及びカナマイシン耐性コロニーをピックアップすることにより、RpsI-kanカセットを挿入したヒトTGF 1遺伝子のゲノムDNA配列を持つプラスミドをスクリーニングした(ヒトTGF 1トランスファープラスミド)(図2B)。

10

【0019】

次に、制限酵素反応により、このヒトTGF 1 トランスファープラスミドから、マウスゲノム配列に由来するH5配列とH6配列を両端に持ち、RpsI-kanカセットを挿入したヒトTGF 1遺伝子のゲノムDNA配列をプラスミドベクターから切り出した(ヒトTGF 1トランスファーフラグメント: 修飾ヒトTGF 1遺伝子フラグメントの作成及び修飾工程)(図2C)。上記と同様の方法で、Red/ET反応の能力を有する大腸菌株に、マウスPodocin BACクローンとともに、ヒトTGF 1トランスファーフラグメントを導入し、この宿主大腸菌内でRed/ET反応を誘導してクロラムフェニコール耐性及びカナマイシン耐性コロニーをピックアップすることにより、マウスPodocin遺伝子の翻訳開始コドンから停止コドンまでのゲノムDNA配列に代えて、ヒトTGF 1トランスファーフラグメントの翻訳開始コドンから停止コドンまでのゲノムDNA配列を正確に置換したマウスPodocin/ヒトTGF 1遺伝子の組換えBACクローンをスクリーニングした(マウスPodocin/ヒトTGF 1 RecBAC Intermediate: Podocin選択用ヒトTGF 1遺伝子フラグメントとする工程)(図2C)。ヒトTGF 1トランスファーフラグメントをマウスPodocin BACクローン導入する際のホモロジーアームとしてPodocin-H5とPodocin-H6に示されるように56塩基のゲノム配列をデザインし、作製を行った。

20

【0020】

H5及びH6は、それぞれ56塩基の長さを持ったプライマーであり、一般的なPCR反応を行うよりも長い塩基数を持っている。本実施形態のトランスジェニックマウスを作成するには、H5及びH6の塩基数は、重要な構成要件の一つである。H5及びH6の塩基数が短い場合には、hTBF 1発現トランスジェニックマウスを作成できない。このため、H5及びH6の塩基数としては、50塩基~60塩基、好ましくは52塩基~60塩基、更に好ましくは54塩基~58塩基である。

30

最後に、ヒトTGF 1遺伝子座のイントロン1配列をPCRで増幅し、ネガティブセレクションによりヒトTGF 1遺伝子のイントロン1に挿入したRpsI-Kanを除去するためのDNA配列とした(ヒトTGF 1リペアーフラグメント)(図2D)。上記と同様の方法で、Red/ET反応の能力を有する大腸菌株にマウスPodocin/ヒトTGF 1 RecBAC Intermediateとともに、ヒトTGF 1リペアーフラグメントを導入し、この宿主大腸菌内でRed/ET反応を誘導してクロラムフェニコール耐性及びストレプトマイシン耐性コロニーをピックアップすることにより、マウスPodocin遺伝子の翻訳開始コドンから停止コドンまでのゲノムDNA配列に代えて、ヒトTGF 1遺伝子の翻訳開始コドンから停止コドンまでのゲノムDNA配列を正確に置換したマウスPodocin/ヒトTGF 1遺伝子の組換えBACクローンの構築を行なった(Podocin_ヒトTGF 1 RecBAC: Podocin-TGF 1 BACトランスジェニック構築物を得る工程)(図2D)。シーケンス解析により、Red/ET反応で接合したH1~H6のゲノムDNA配列を確認した(図3)。

40

【0021】

3. マウスPodocin/ヒトTGF 1 RecBAC組換えBAC発現コンストラクトの精製

50

マウスPodocin_ヒトTGF 1 RecBAC遺伝子発現コンストラクトである組換えBACクローンにより形質転換したDH10B細胞を、クロラムフェニコールを含むLBアガー培地上でクローニングし、そのシングルコロニーをピックアップして液体培地で一昼夜震盪培養した。マウスPodocin_ヒトTGF 1 RecBAC遺伝子発現コンストラクトを、一部改変した阿部らの方法（非特許文献4）に従い、マウスPodocin_ヒトTGF 1 RecBAC組換えBACクローンをプラスミド抽出キット（マッキリーナーゲル社、Nucleobond BAC100キット）を用いて精製し、P I-SceIを加えて37℃、16時間反応した。

トランスジェニックマウス作出に用いる発現コンストラクトを得るために、ゲノムBACクローンをP I-SceIで消化し、パルスフィールド電気泳動で分離したところ、150~200 kbほどの発現コンストラクトを含む長鎖DNA断片が生成していることが確認できた。これらのDNA断片をUV照射によるダメージを避けてゲルから切り出し、電気溶出、透析により精製した。分析用の1%アガロースゲル電気泳動により、精製した発現コンストラクトの純度と濃度を調べたところ、純粋な長鎖の発現コンストラクトが回収されていた。そのDNA濃度は181.2 ng/μlであり、トランスジェニックマウス作製に供するのに十分な濃度であった（図4A, B, C）。

【0022】

4. マウスPodocin/ヒトTGF 1 RecBAC発現コンストラクトのマウス胚への注入

雌性C57BL/6J マウスに妊馬血清性ゴナドトロピン(PMSG)及びヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を投与して過排卵を誘起し、同系統の雄性マウスと交配した後、受精卵を採取した。マイクロマニピレーターを用いて、C57BL/6J マウスの前核期胚の雄性核に、精製したマウスPodocin_ヒトTGF 1 RecBAC発現コンストラクトを直接注入した。このDNA注入胚を偽妊娠誘起した受胎雌マウスの卵管に移植した（トランスジェニックマウスを得る工程）。

前記のようにPMSG及びhCG投与により過排卵誘起した雌性マウスから、受精卵を採取し、マイクロインジェクション法によりマウスPodocin_ヒトTGF 1 RecBAC発現コンストラクトを導入した。偽妊娠処置したマウスの卵管に、発現コンストラクトを導入した受精卵を移植した。過排卵誘起して交配したC57BL/6J 雌性マウスから、合計407個の受精卵を採取できた。マイクロインジェクション法により合計392個の受精卵にマウスPodocin_ヒトTGF 1 RecBAC発現コンストラクトを注入した。マイクロインジェクションを受けたマウス受精卵を顕微鏡下で観察したところ、注入操作によるダメージで死滅した受精卵は少なく、合計360個の受精卵はマイクロインジェクションを受けた後も安定な状態を保っていた。これらの受精卵のうち、ダメージなく発現コンストラクトを注入できた344個の受精卵を偽妊娠マウスに移植できた。

【0023】

5. マウスPodocin_ヒトTGF 1 RecBACトランスジェニックマウス・ファウンダーのサザンスクリーニング

マイクロインジェクション法によりマウスPodocin_ヒトTGF 1 RecBAC発現コンストラクトを導入したC57BL/6J マウスの受精卵から、トランスジェニックマウスのファウンダー候補となる産子を得て、サザン解析を行い、ファウンダー個体を同定した。合計392個の受精卵に発現コンストラクトを注入し、合計344個の注入胚を偽妊娠マウスに移植して自然分娩させたところ、これらの遺伝子を注入した受精卵から合計52頭のマウス産子を得た。52頭全ての個体を離乳まで育成した。マウスPodocin_ヒトTGF 1 RecBAC発現コンストラクトを導入した初期胚からの産子数、離乳数は良好であった。このことから、発現コンストラクトを注入したこと自体によるマウス受精卵の発生、分化への悪影響はなかったと考えられた。トランスジェニックマウスのファウンダー候補となる産子から抽出したゲノムDNA断片と[32P]ラベル化プローブのハイブリダイゼーションにより、マウスPodocin_ヒトTGF 1 RecBAC発現コンストラクトを導入したトランスジェニックマウス・ファウンダー個体として8頭を同定した。これらのトランスジェニックマウス・ファウンダー個体に導入した発現コンストラクトのコピー数は1コピーから3コピーであった（図5）。ランダムプライム法により [32P]ラベル化されたPodocin_ヒトTGF 1 RecBACをトランスジェニ

ックマウス・ファウンダー候補個体のゲノムDNAの断片がトランスファーされたサザンブロットとともにインキュベートしてハイブリダイズさせた。ナイロンメンブレンを洗浄して非特異的に結合した放射性プローブを除去し、特異的に結合する断片をオートラジオグラフィで検出した。図中のマーカーはM1:NEB, 1KB ladderである。

【 0 0 2 4 】

6 . Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

ヒトTGF β 1 TGマウスの各組織におけるヒトTGF β 1遺伝子の発現量を調べるため、逆転写酵素PCR (RT-PCR) を行った。各組織からトリゾール (TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA)) を用いて全RNAを抽出した。RT-PCRに使用したプライマーの配列は、次の通りであった。

ヒトTGF β 1, forward 5' - AAG ACT ATC GAC ATG GAG CTG G-3' (配列番号7) 及び、reverse 5' -GTA TCG CCA GGA ATT GTT GCT G-3' (配列番号8); ヒトGAPDH, forward 5' - CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3' (配列番号9) 及び reverse 5' -TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3' (配列番号10); マウスGAPDH, forward 5' -CCC TTA TTG ACC TCA ACT ACA TGG T-3' (配列番号11) 及び reverse 5' -GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC TG-3' (配列番号12) であった。全PCRは、各増幅反応においてプラトーとなる前の状態で実施した。PCR反応物は、2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、バンドを臭化エチジウムで染色した後、紫外光にて観察した。マウスTGF β 1の発現は殆ど全ての臓器に認められた。一方、ヒトTGF β 1の発現は腎臓のみに認められた (図6)。

【 0 0 2 5 】

7 . 腎臓の組織学的検査

マウスを絶命後、腎循環を生理食塩水で洗浄した後、腎臓を取り出した。腎臓はホルマリン (10%中性緩衝液) でかん流し、ガスで膨らませて、ホルマリン中にて24時間固定した後、パラフィンに包埋した。5 μ m厚さの組織検査用切片を作成後、パラフィンを除き、生理食塩-リン酸緩衝液にて数回洗浄した。組織切片は、ヘマトキシリン/エオジンの染色法にて処理した。腎臓の組織学的検査は、オリンパスDP70デジタルカメラを装着したオリンパスBX50顕微鏡を用いて行った。野生型マウスの糸球体は正常所見を示した。マウスPodocin-ヒト/TGF β 1 RecBAC-TGマウスは糸球体の委縮、糸球体線維症、腎間質の線維症が認められた (図7)。野生型マウスの糸球体(A,B)は正常所見を示す。Podocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスは糸球体の委縮(C,D)、糸球体線維症 (E)、腎間質の線維症(F)が認められた。

腎組織でのコラーゲン沈着の程度を検討するため、組織切片はマッソントリクロームの染色法にて処理した。その結果、野生型マウス(A,B,C)では腎組織のコラーゲン沈着は正常範囲であったが、マウスPodocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウス (D,E,F)では腎組織のコラーゲン沈着は高度であった (図8)。

【 0 0 2 6 】

< 糖尿病に罹りやすいことを確認する試験 >

血漿中のBUN及びクレアチニンを測定した結果、マウスPodocin-ヒト/TGF β 1 RecBAC-TGマウス (トランスジェニックマウス) は、いずれの血漿中濃度も上昇しており16週齢から腎機能障害を起こしていることが分かった (図9)。そこで、このトランスジェニックマウスの腎障害が糖尿病により進展しやすいか否かに関し試験を行った。また、その際、糖尿病を発症しやすいか否かに関しても試験を行った。

1 . 試験方法

(i) 野生型マウス (n=4) 及びマウスPodocin-ヒト/TGF β 1 RecBAC-TGマウス (n=5) に対し、ストレプトゾトシン (STZ: 40mg/kg) を1日1回、4日間投与し、糖尿病を誘導した。対象として、野生型マウス (n=3) 及びマウスPodocin-ヒト/TGF β 1 RecBAC-TGマウス (n=5) に生理食塩水 (saline) を投与した。

試験開始前 (day0)、試験開始後7日目 (day7)、14日目 (day14)、21日目 (day21)、28日目 (day28) 及び35日目 (day35) に各マウスから採血を行い、血糖値を調べた。

(ii) 試験開始後28日目のマウスを用い、ブドウ糖負荷試験を行った。マウス腹腔内に

1g/kgのブドウ糖を投与し、15、30、60及び120分後に血糖値を測定した。

(iii) 試験終了後、各マウスについて、CT検査を行い、腎障害の程度を調べた。併せて、顕微鏡を用いて、腎組織の状態を確認した。

(iv) 上記(i)、(ii)の空腹時血糖値を用い、各群のマウスについて、HOMA-IR (homeostasis model assessment) の検討を行った。

2. 試験結果

図10には、各群のマウス血糖値を示した。生理食塩水を与えた群では、野生型(WT/SAL)及びトランスジェニックマウス(TGF-1 TG/SAL)のいずれも血糖値には統計的な有意差は認められなかった。一方、STZを投与した群では、野生型(WT/STZ)においては、有意差は見られなかったものの、血糖値が上昇した。トランスジェニックマウス(TGF-1 TG/SAL)では、有意に($p < 0.05$)血糖値の上昇が認められた。 10

図11には、ブドウ糖負荷試験の結果を示した。STZ投与群では、コントロール(SAL)群に比べて、血糖値が上昇していた。特に、トランスジェニックマウス(TGF-1 TG/SAL)では、ブドウ糖投与から30及び60分後に有意な($p < 0.05$)血糖値上昇が認められた。この結果、トランスジェニックマウスは、4週齢において糖尿病を発症していることが分かった。

図12Aには、STZ投与前及び投与後のトランスジェニックマウスのCT画像を、図12Bには、試験前後における腎臓のサイズをそれぞれ示した。トランスジェニックマウスの腎臓(TG)は、STZの投与によって顕著に(約1.6倍)大きくなった。

図13には、腎組織を顕微鏡で観察した結果を示した。野生型マウスでは、STZ投与によって大きな変化は認められなかった(図13A、図13B)。トランスジェニックマウスでは、STZ投与によって、硬化症の病態が観察された(図13C)。 20

このように、マウスPodocin-ヒト/TGF-1 RecBAC-TGマウスは、野生型マウスに比べ、ストレプトゾトシン(STZ)の投与によって、糖尿病になりやすいことが分かった。

図14には、4群(野生型マウス/生理食塩水投与群、トランスジェニックマウス/生理食塩水投与群、野生型マウス/STZ投与群、トランスジェニックマウス/STZ投与群)のそれぞれについて、下記式に基づきHOMA-IRを求めた結果を示した。

$$\text{HOMA-IR} = \text{空腹時血中インスリン濃度} (\mu\text{U}/\text{mL}) \times \text{空腹時血糖値} (\text{mg}/\text{dL}) \times 1/405$$

トランスジェニックマウス/STZ投与群では、有意にHOMA-IRが増加していた。このことから、トランスジェニックマウスでは、TGF-1が高度に発現されることにより、インスリン抵抗性を獲得し、II型糖尿病に罹患しやすくなったものと考えられた。 30

【0027】

<バイオマーカーとしてのTGF-1測定の重要性>

ところで、肺線維症、糸球体硬化症、肝硬変などの臓器線維症の病態形成にTGF-1が重要な役割を果たしていることが知られている。このような線維症の患者の中、様々臨床所見・予後のパターンを示す例が報告されている。これは線維症の臨床表現型(phenotype)と呼ばれている。

但し、血漿中TGF-1濃度とTGF-1型の線維症との関連については十分に解明されていない。そこで、本実施形態では、血漿中TGF-1を測定することにより、TGF-1型の線維症のパターンを同定できることを示す。 40

【0028】

1. マウスPodocin/ヒトTGF-1 Rec BAC TGマウスにおけるTGF-1濃度の検討

TGF-1は(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)市販のELISAキットを用いて、使用マニュアルに従って測定した。マウスPodocin/ヒトTGF-1 Rec BAC TGマウスでは、血液中及び尿中のヒトTGF-1濃度は、野生型マウスに比べ、有意に高値を示した(図15)。

2. マウスSurfactant protein C/ヒトTGF-1 Rec BAC TGマウスにおけるTGF-1濃度の検討

本発明者は、各種の工夫を織り込みながら、TGF-1を特定の臓器で発現させるトランス 50

ジェニックマウスの確立を行っている。これまでに確立したトランスジェニックマウスとして、肺で特異的にヒトTGF β 1を発現するトランスジェニックマウス（マウスSurfactant protein C/ヒトTGF β 1 Rec BAC TGマウス）がある。

そこで、このトランスジェニックマウスを用いて、血漿中TGF β 1濃度と肺線維症との関係を調べた。マウスSurfactant protein C/ヒトTGF β 1 Rec BAC TGマウスでは、血漿中のヒトTGF β 1濃度は、野生型マウスに比べ、有意に高値を示した（図16）。血漿中のヒトTGF β 1濃度は早期（4週齢）に高くなり、10週令以上のマウスでは、血漿中TGF β 1濃度がそのまま維持されることが分かった（図17）。

【0029】

3. マウスSurfactant protein C/ヒトTGF β 1 Rec BAC TGマウスにおけるTGF β 1濃度とマイクロCT (computed tomography) の関連性 10

マウスモデルにおける肺線維症の評価は、マイクロCTを用いて行った。CTデータは、イソフルランの吸入によって呼吸抑制された麻酔下にあるマウスを用いて得られた。肺線維症のCT所見は1から8までスコア化して評価した。CT肺線維症スコアと血漿中TGF β 1濃度は、有意に正の相関を示した。3000pg/ml（カットオフ値）以上の血漿中TGF β 1濃度があるマウスでは、CTスコアの3.5以上が認められた（図18）。従って、3000pg/ml以上の血漿中TGF β 1濃度があるマウスでは、CT所見がなくても肺線維症があることが判断できることが明らかになった。

4. 線維症患者における血漿中TGF β 1濃度の検討

次に、ヒト肺線維症患者と血漿中TGF β 1濃度との関係を調べた。肺線維症患者（38名）及び健常者（3名）を対象として、血漿中TGF β 1濃度を測定した。TGF β 1濃度は、健常者に比べ、肺線維症患者では有意に高値を示した。（図19(A)）各症例の血漿中TGF β 1濃度を検討すると、TGF β 1濃度が高い症例と低い症例が認められた。（図19(B)）このように、TGF β 1が高い症例は、TGF β 1型の線維症であることが考えられた（図19）。 20

【0030】

マウスpodocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスにおいて、図7、図8に示されるように、腎臓の線維化が進展すると、図15Aに示すように、血液中ヒトTGF β 1濃度は、野生型マウスに比べ、約2倍の上昇を示した。図15Bに示すように、尿中ヒトTGF β 1濃度も、野生型マウスに比べ、約2倍の上昇を示した。図6に示されるように腎臓にのみヒトTGF β 1が特異的に発現しているため、血液及び尿中ヒトTGF β 1濃度の上昇は、腎臓の線維化を反映していると考えられた。このように、血液及び尿中ヒトTGF β 1濃度が、腎の線維化を反映するマーカーとなり得ることが分かった。 30

腎では、糸球体の線維化により、発現が上昇したTGF β 1が早期から尿中に排泄されるので、早期の線維化を反映し、線維化の早期診断のマーカーとして有用である可能性がある。一方、糸球体が線維化により障害され、ネフロンの数が減少した場合に、尿中へのTGF β 1の排泄が低下し、その結果として、血液中TGF β 1が上昇すると考えられる。このため、血液中のTGF β 1の上昇は、線維化の重症度を反映する可能性がある。特に、マウスpodocin-ヒトTGF β 1 RecBAC-TGマウスの繁殖においては、野生型マウスの診断とは異なり、腎線維症を自然発症するモデルマウスのため、腎線維症の発症時期確認には極めて有効な指標とできる。このことで、繁殖したマウスを効率良く発症確認でき、腎線維症疾患に関する研究機関への提供が容易になるものである。同様にマウスSurfactant protein C/ヒトTGF β 1 Rec BAC TGマウスの繁殖においても、血液中TGF β 1濃度が肺線維症の発症確認に有効である。 40

【0031】

線維症をおこす臓器に依っては、血液中TGF β 1への影響が異なることも考えられる。このため、各臓器に特異的にヒトTGF β 1発現させることで、詳細な解析が可能となり、マーカーとしての有用性が検討できる。

図15では、血漿中ヒトTGF β 1濃度3000pg/mlをカットオフ値とした。測定マウス数や週齢のデータを積み上げることによって、週齢ごとのカットオフ値を定めることも可能である。週齢が若い段階で発症時期や可能性を見極めることにより、研究用TGマウスの提供 50

を安定させることができる。

図15Bによれば、尿中ヒトTGF β 1濃度300pg/mlをカットオフ値として、これ以上の尿中TGF β 1濃度があるマウスでは、CT所見がなくても肺線維症があることが判断できる。血漿中及び尿中TGF β 1濃度の両方を測定することで、腎線維症の判定精度を上げること、及び腎線維症の重症度判定に利用できることは本発明の範囲に含まれる。

【0032】

図15Bにおいて、個別にはTGF β 1の濃度が高い例と低い例がある。TGF β 1濃度が高い群では、TGF β 1が線維症の主な原因であることが考えられる。TGF β 1濃度が低い群においても、健常者のデータより高い値を示しており、症状を推定するための有意なマーカーの一つとして使える。人間の肺線維症における血漿中TGF β 1濃度によれば、マウスの例にみられるように、今後データをさらに積み上げることで、人の血漿中TGF β 1濃度測定とカットオフ値により、高精度で人の肺線維症判定に使用することもできる。

図16、図17に示すように、TGマウスの血漿中TGF β 1濃度と、予め定めたカットオフ値でTGマウスの肺線維症判定が容易であることが現れている。肺線維症TGマウスは腎線維症TGマウスとは異なる遺伝子組み込みを行い、さらに煙草の煙吸引などの負荷をかけて育成する。その作成方法及び育成方法と組み合わせて判定することで、容易に肺線維症、腎線維症の判定ができる。前記したように尿と血漿中のTGF β 1濃度の両方を組み合わせて判定すれば、線維症の発症箇所が肺であるか腎臓であるかの判定も可能になる。人の場合はすべて自然発症であるため、マウスのように遺伝子組み込み方法との組み合わせによる判断指標はあり得ない。このため、先に述べた血液、尿以外の数種類の体液中のTGF β 1濃度を測定し、それぞれの体液ごとのTGF β 1濃度のデータを今後積み重ねてカットオフ値を決めていくことにより、線維症等の症状がどの内蔵器官で発症しているのかを容易な方法で推定できるようになる。この応用は、本発明の技術的範囲に含まれる。

マウスにおいて、TGF β 1濃度のカットオフ値を定める際、同じ育成群の中から、データを積み上げてカットオフ値を定めることもできるし、別の育成群や、過去の蓄積データから統計的に定めたカットオフ値を用いることもできる。

【0033】

<トランスジェニックマウスの病態を評価するためのキット>

次に、ヒトTGF β 1を発現するトランスジェニックマウスの病態を評価するためのキットの内容について説明する。

キットには、少なくとも(1)トランスジェニックマウスから体液を採取するための器具、(2)採取した体液からヒトTGF β 1を含む成分を分離するためのチューブ及び(3)ヒトTGF β 1を測定するためのが含まれている。

(1)体液として血液を採取する場合には、器具として、眼底から血液を採取するための微小ガラス管、尾静脈から血液を採取するためのカミソリと微小ガラス管、足根部・頸動脈・頸静脈・心臓・腹大動脈・腹大動脈などから血液を採取するための注射器などが用いられる。血液を用いる場合には、血漿を分離するために、抗凝固剤（ヘパリン、EDTA、クエン酸など）を添付することが好ましい。なお、微小ガラス管を用いる場合には、内壁面にヘパリンをコートしたものをを用いることが好ましい。また、必要に応じて、麻酔用の薬品（ペントバルビタール、チオペンタール、ケタミン、エーテル、イソフラン、セボフランなど）を組み合わせることもできる。

また、体液として尿を採取する場合には、時計皿、代謝ケージなどが用いられる。

(2)体液として血液を用いる場合には、チューブ（遠心管）として、30 μ L~1mL程度の容量を持つものが使用できる。

(3)ELISAには、適当なウエル数（例えば、96ウエル、192ウエル又は384ウエル）を備えたプレート、（マウスTGF β 1を認識せず）ヒトTGF β 1を特異的に認識する第1抗体溶液、サンドイッチ法を構成するためのヒトTGF β 1を特異的に認識する第2抗体溶液、第2抗体を認識する発色用抗体及び発色用試薬を備えることができる。

上記キットを用いて、トランスジェニックマウス血液中のヒトTGF β 1濃度を測定するための手順について、簡単に説明する。

10

20

30

40

50

まず、トランスジェニックマウスを保定器に入れた後、尾部を軽く温めて血管を拡張させる（このとき、動物自体を数分間保温しても血管を拡張させられる）。メスで尾部を傷つけ、切開部分が開くようにして血液を滴らせるようにして、微小ガラス管（ヘマトクリット管）を用いて採血する。この方法は、マウスを殺すことなく、実施できるので、経時的な変化を見るために好ましい。なお、外側足根静脈から採血することもできる。また、マウスを殺してもよい場合には、麻酔下にて、針付き注射器を用いて、心臓・腹大動脈・腹大静脈から大量の血液（数百 μL ～1 mL程度）を採取することもできる。

採取した血液をチューブに移し、1000～1500 $\times g$ にて、15～30分間、4 で遠心分離することで、ヒトTGF β 1を含む血漿成分を分離・採取する。測定精度を向上するために血漿成分を希釈する場合は、その希釈率を測定結果に反映する。

この血漿中のTGF β 1濃度をELISA系によって測定する。サンドイッチ法を用いる場合には、まず第1抗体をELISAプレートの固相にコートした後に、BSA等でブロックし、このサンプル血漿をそのまま（或いは、適当に希釈して）添加する。第1抗体とヒトTGF β 1を結合させた後に、ウエル中の溶液を除き、PBSで数回洗浄する。その後、第2抗体をウエル中に添加して、第1抗体と結合したヒトTGF β 1と反応させた後にウエル中の溶液を除き、PBSで数回洗浄する。次に、第2抗体を認識する標識抗体をウエル中に添加して反応させた後、ウエル中の溶液を除き、PBSで数回洗浄後、発色用試薬をウエル中に添加し、適当な時間後にプレートリーダーを用いて、発色の程度を測定する。同時に測定した検量線に基づき、検体中のヒトTGF β 1濃度を求める。

こうして求めたトランスジェニックマウスの血液中ヒトTGF β 1濃度と、カットオフ値とを比較することで、トランスジェニックマウスの病態を評価できる。

【0034】

<ヒトの線維症を診断するためのキット>

次に、ヒトの線維症を診断するためのキットの内容について説明する。

キットには、少なくとも(1)被験者から体液を採取するための器具、(2)採取した体液からヒトTGF β 1を含む成分を分離するためのチューブ及び、(3)ヒトTGF β 1を測定するためのELISAが含まれている。

(1)体液として血液を採取する場合には、器具として、針付き注射器を用いることが好ましい。血液を用いる場合には、血漿を分離するために、抗凝固剤（ヘパリン、EDTA、クエン酸など）を添付することが好ましい。体液として尿を採取する場合には、カテーテルが用いられる。

(2)体液として血液を用いる場合には、チューブ（遠心管）として、1mL～30mL程度の容量を持つものが使用できる。

(3)ELISAには、適当なウエル数（例えば、96ウエル、192ウエル又は384ウエル）を備えたプレート、ヒトTGF β 1を特異的に認識する第1抗体溶液、サンドイッチ法を構成するためのヒトTGF β 1を特異的に認識する第2抗体溶液、第2抗体を認識する発色用抗体及び発色用試薬を備えることができる。

上記キットを用いて、血液中のヒトTGF β 1濃度を測定するための手順について、簡単に説明する。

まず、注射器を用いて、血液を採取する。採取した血液をチューブに移し、1000～1500 $\times g$ にて、15～30分間、4 で遠心分離することで、ヒトTGF β 1を含む血漿成分を分離・採取する。

この血漿中のTGF β 1濃度をELISA系によって測定する方法は、上記<トランスジェニックマウスの病態を評価するためのキット>にて述べた方法に従う。

こうして求めた血液中ヒトTGF β 1濃度と、カットオフ値とを比較することで、ヒトの線維症の進行程度を評価するための判断データの一つが得られる。最終的には、医師等の専門家の判断に従う。

このように本願実施形態によれば、腎特異的にヒトTGF β 1を発現し、自然発症的に腎線維症を発症するTGマウスを提供できた。このトランスジェニックマウスは、生後15週齢から自然的に腎線維症・腎不全を発症し、生後20週～26週で死亡し始める。この発病が早く

10

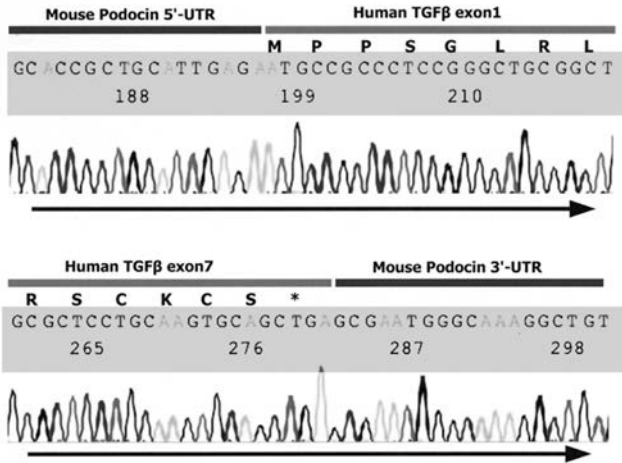
20

30

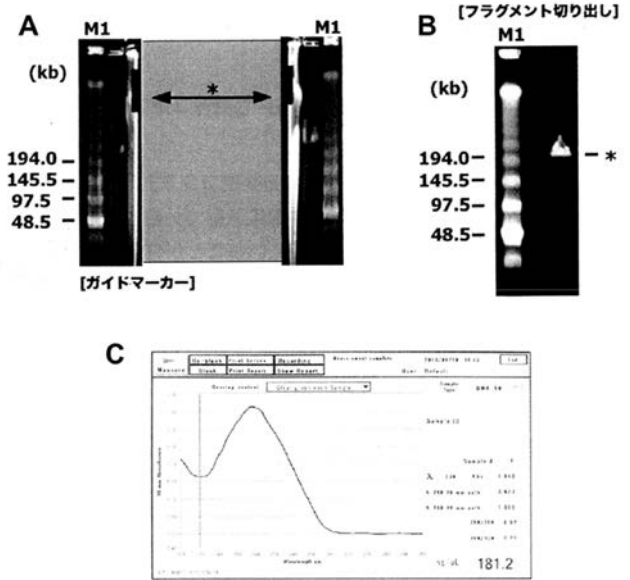
40

50

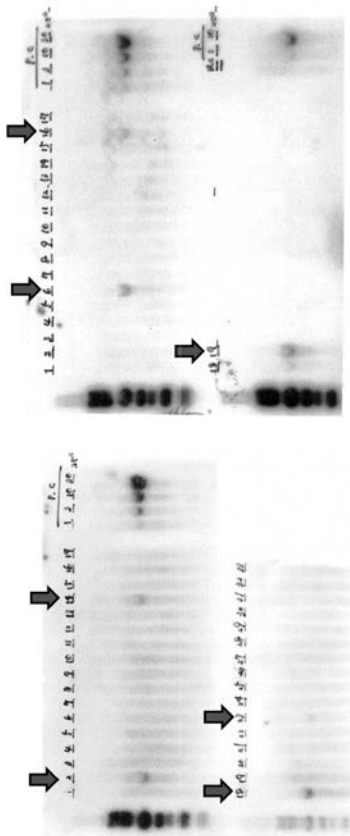
【 図 3 】



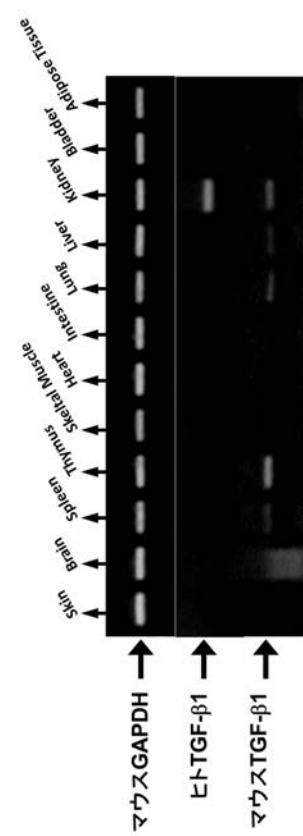
【 図 4 】



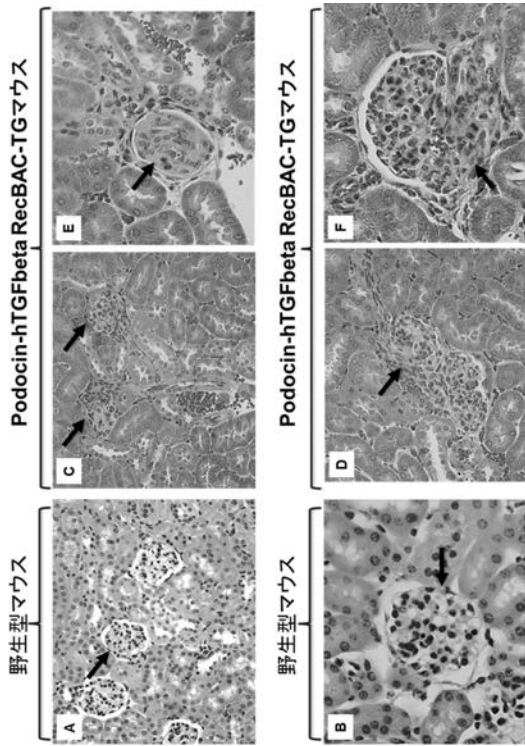
【 図 5 】



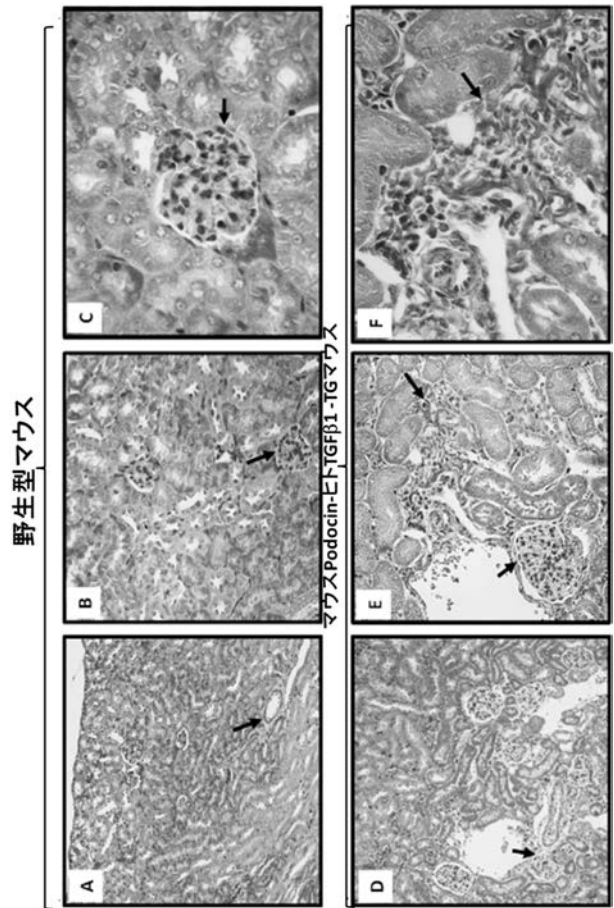
【 図 6 】



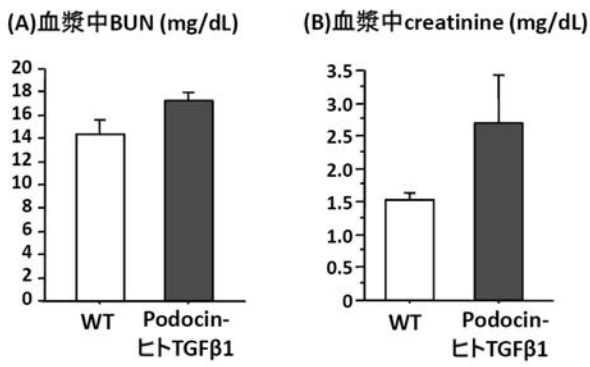
【 図 7 】



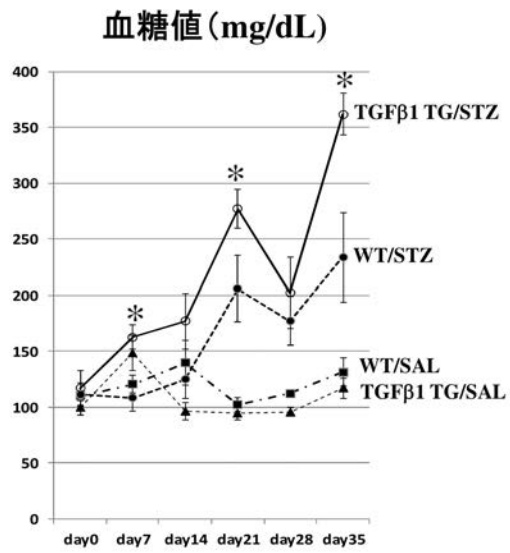
【 図 8 】



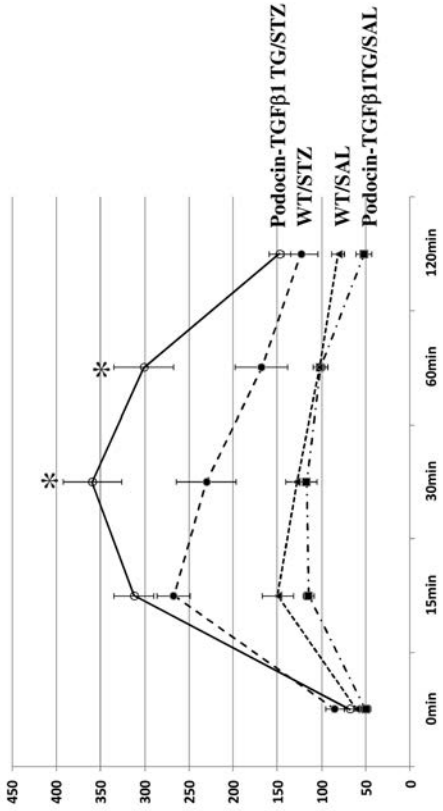
【 図 9 】



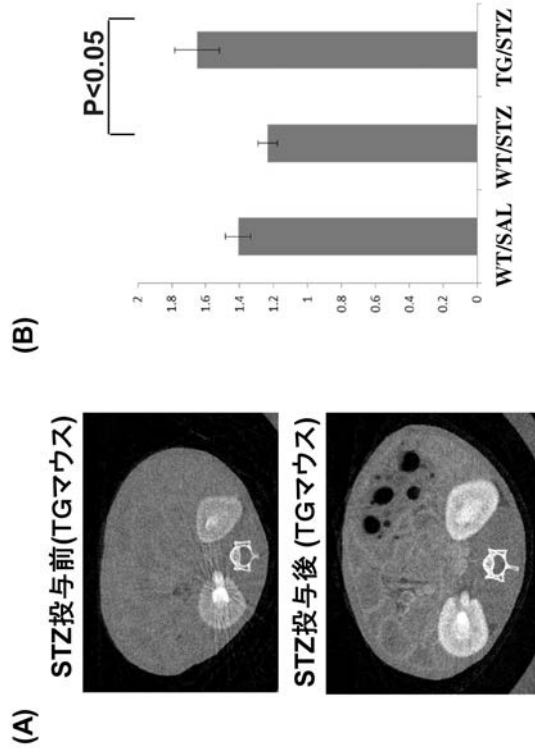
【 図 10 】



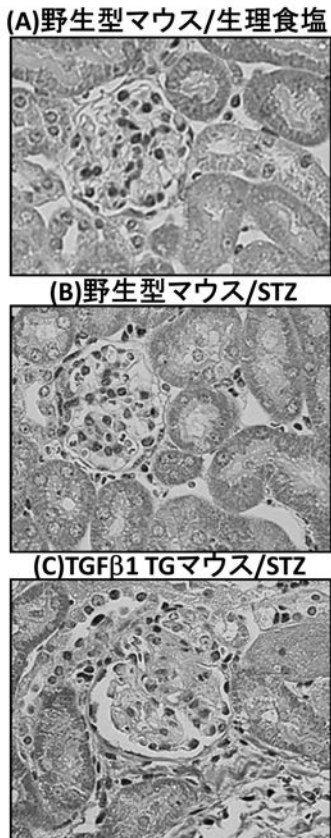
【 図 1 1 】



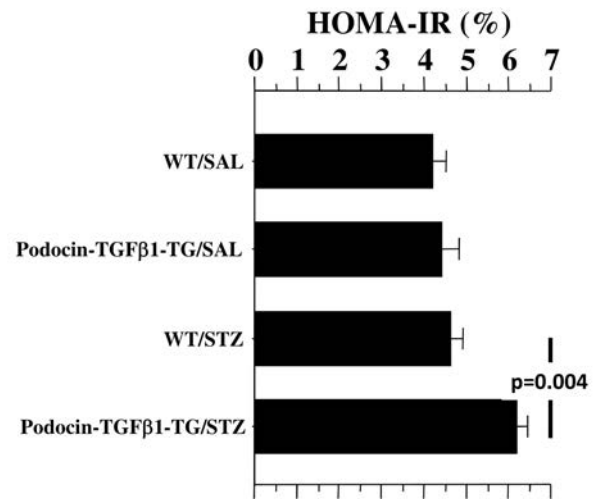
【 図 1 2 】



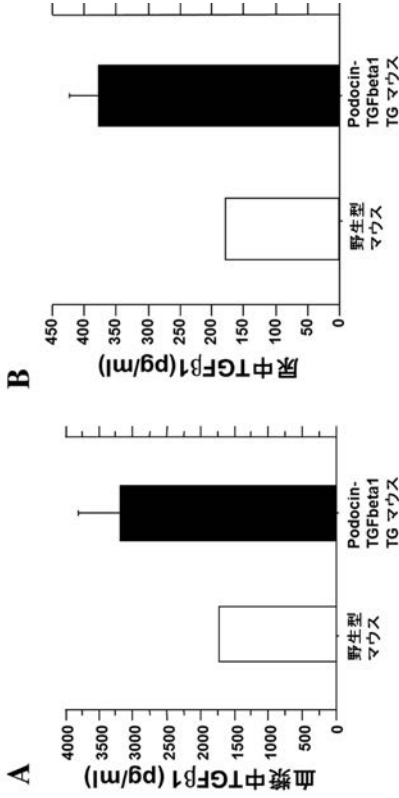
【 図 1 3 】



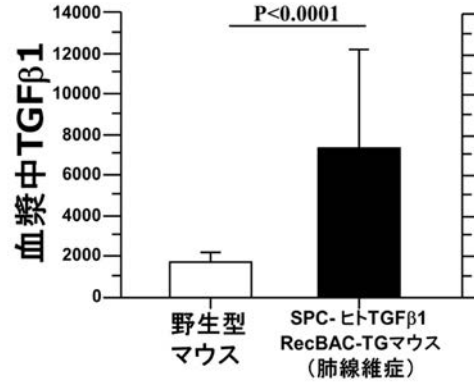
【 図 1 4 】



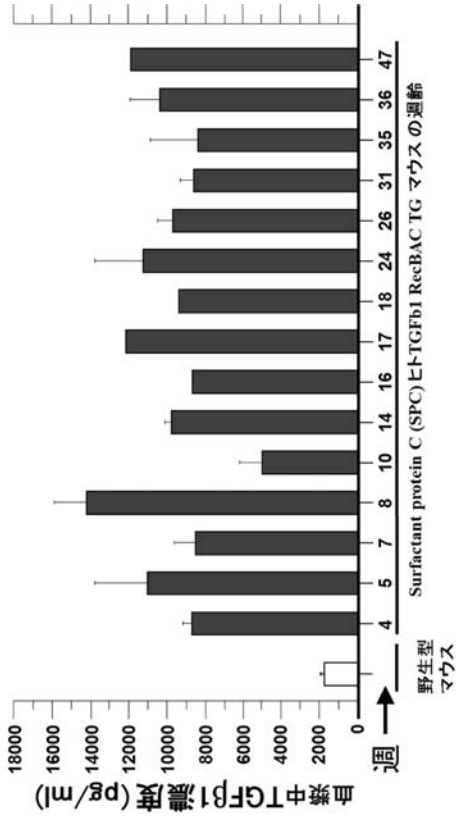
【図 15】



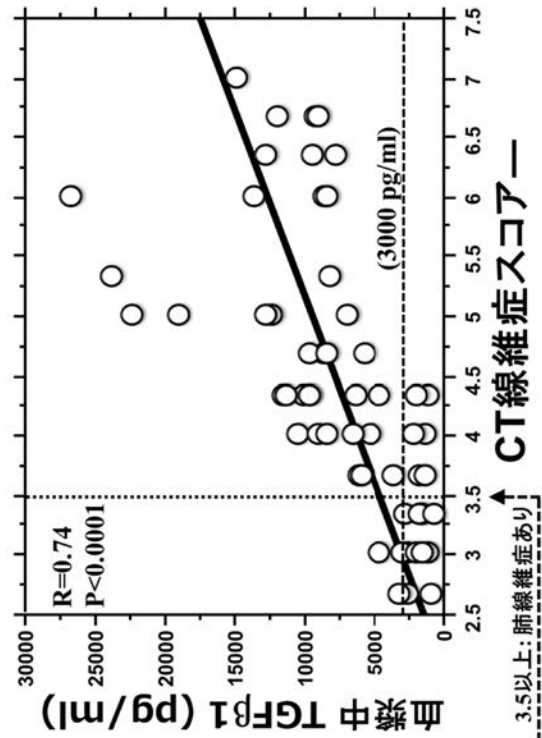
【図 16】



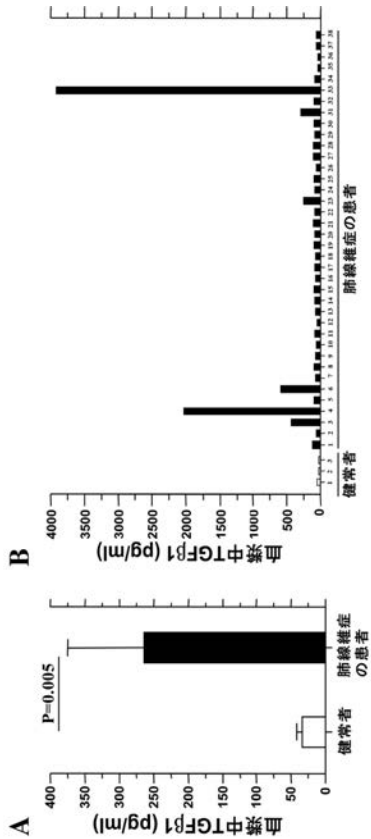
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【配列表】

2015199144000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年11月26日(2015.11.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

マウスの *Podocin* のプロモーター領域と、その下流に配置されて発現を制御されるヒト形質転換因子 1 (ヒト TGF 1) の全遺伝子領域とを含み、前記ヒト TGF 1 の全遺伝子領域は、7 個のエキソンと 6 個のイントロンを含むと共に、前記ヒト TGF 1 が、非活性型 TGF 1 として腎臓で発現されて、細胞外で活性型 TGF 1 となり、自然的に腎線維症を発症し始めるトランスジェニックマウス。

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

(削除)

【請求項5】

前記トランスジェニックマウスは、生後 15 週齢から自然的に腎線維症を発症し始めることを特徴とする請求項 1 に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 6】

上記トランスジェニックマウスの系統は、C57BL/6Jであることを特徴とする請求項 1 に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 7】

マウスの *Podocin* のプロモーター領域と、その下流に配置されて発現を制御されるヒト形質転換因子 1 (ヒト *TGF- β 1*) の全遺伝子領域とを含み、前記ヒト *TGF- β 1* の全遺伝子領域は、7 個のエキソンと 6 個のイントロンを含むと共に、前記ヒト *TGF- β 1* が、非活性型 *TGF- β 1* として腎臓で発現されて、細胞外で活性型 *TGF- β 1* となり、自然的に腎線維症を発症し始めるトランスジェニックマウスの作成方法であって、

(1) ヒト *TGF- β 1* 遺伝子を含む BAC において、ヒト *TGF- β 1* 遺伝子のイントロン部分に選択用カセットを組み込み、選択用遺伝子導入ヒト *TGF- β 1* 遺伝子を得る選択用遺伝子組換え工程、(2) 前記選択用遺伝子導入ヒト *TGF- β 1* 遺伝子の 5' - 側及び 3' - 側に、50 塩基 ~ 60 塩基の一对のプライマーを使用した PCR 反応を用いて、マウス *Podocin* プロモーターの下流の配列に相同的な配列を導入して、修飾ヒト *TGF- β 1* 遺伝子フラグメントとする修飾工程、(3) 5' - 側及び 3' - 側にフランキング配列を有するマウス *Podocin* 全コード配列を含む BAC において、前記修飾ヒト *TGF- β 1* 遺伝子フラグメントを、前記マウス *Podocin* プロモーター領域の下流側に転移させて、*Podocin* 選択用ヒト *TGF- β 1* 遺伝子フラグメントとする工程、(4) 前記選択用ヒト *TGF- β 1* 遺伝子フラグメントを取り除いて、*Podocin-TGF- β 1* BAC トランスジェニック構築物を得る工程、(5) 前記 *Podocin-TGF- β 1* BAC トランスジェニック構築物から *Podocin-TGF- β 1* 遺伝子を精製し、マウス胚にマイクロインジェクションして、トランスジェニックマウスを得る工程を備えることを特徴とするトランスジェニックマウスの作成方法。

【請求項 8】

前記トランスジェニックマウスは生後 15 週齢から自然的に腎線維症を発症し始めるトランスジェニックマウスであって、前記修飾ヒト *TGF- β 1* 遺伝子フラグメントを作成する際に用いられる PCR 反応用の一对のプライマーの塩基数は、54 塩基 ~ 58 塩基であることを特徴とする請求項 7 に記載のトランスジェニックマウスの作成方法。

【請求項 9】

(1) 腎臓において特異的にヒト *TGF- β 1* の全長を発現するトランスジェニックマウスにおいて、血漿中及び尿中 *TGF- β 1* 濃度が野生型マウスの血漿中及び尿中 *TGF- β 1* 濃度よりも有意に高いこと、及び血漿中ヒト *TGF- β 1* 濃度と CT 線維症スコアとの相関関係を示すグラフから前記トランスジェニックマウスが線維症を発症する所定の血漿中ヒト *TGF- β 1* 濃度であるカットオフ値を求める工程、(2) 前記トランスジェニックマウスから血液を採取した後に、血漿中ヒト *TGF- β 1* 濃度を測定する工程、(3) 前記カットオフ値と測定された血漿中ヒト *TGF- β 1* 濃度とを比較し、血漿中ヒト *TGF- β 1* 濃度が前記カットオフ値以上の場合に、前記トランスジェニックマウスが腎線維症を発症していると判断するヒト *TGF- β 1* 発現トランスジェニックマウスの病態評価方法。

【請求項 10】

(削除)

【請求項 11】

(削除)

【請求項 12】

マウスの *Podocin* のプロモーター領域と、その下流に配置されて発現を制御されるヒト形質転換因子 1 (ヒト *TGF- β 1*) の全遺伝子領域とを含み、前記ヒト *TGF- β 1* の全遺伝子領域は、7 個のエキソンと 6 個のイントロンを含むと共に、前記ヒト *TGF- β 1* が、非活性型 *TGF- β 1* として腎臓で発現されて、細胞外で活性型 *TGF- β 1* となり、自然的に腎機能障害である腎線維症を発症し始めるトランスジェニックマウスに対し、前記腎機能障害発症の週齢以降にストレプトゾトシン (STZ) を投与することにより、糖尿病を発症させる糖尿病誘発試験方法。

【請求項 13】

前記腎線維症の発症が生後 15 週齢であり、生後 16 週齢以降にストレプトゾトシン (STZ) を投与することにより、糖尿病を発症させる請求項 12 記載の糖尿病誘発試験方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/068238
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A01K67/027(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i 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, C12N15/09, G01N33/53 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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN),		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MACARY, G., et al., Transgenic mice expressing nitroreductase gene under the control of the podocin promoter: a new murine model of inductible glomerular injury, Virchows Arch., 2010, 456, pp.325-337, entire text, particularly, summary, Materials and methods, fig. 1, 2, 5	1-8
Y	JP 2006-6103 A (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 12 January 2006 (12.01.2006), entire text; particularly, claims; examples; paragraph [0010] (Family: none)	1-8
<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 04 September 2015 (04.09.15)		Date of mailing of the international search report 15 September 2015 (15.09.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/068238

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Tsutomu INOUE, "Hepatocyte Growth Factor (HGF) Prevent Progression of Renal Interstitial Fibrosis via Its Counteraction Against Transforming Growth Factor-beta (TGF-.BETA.) in 5/6 Nephrectomized Mice", Journal of Saitama Medical University, 2002.01, 29(1), pages 13 to 26, particularly, summary, Introduction	1-8
Y	LIU, S.-F., et al., Dioscorea alata Attenuates Renal Interstitial Cellular Fibrosis by Regulating Smad- and Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling Pathways, PLoS ONE, 2012.11.08, 7(11), e47482, particularly, summary, introduction	1-8
Y	Shoko HARA et al., "TGF- β in tissue fibrosis", Journal of Clinical and Experimental Medicine, 04 September 2010 (04.09.2010), 234(10), pages 977 to 982, entire text, particularly, summary, fig. 1	1-8
Y	JP 2013-94071 A (Mie University), 20 May 2013 (20.05.2013), entire text; particularly, claims; examples (Family: none)	1-10
Y	Chihiro AKAZAWA et al., "Establishing Sox10- VENUS transgenic mice utilizing BAC recombination in E. coli for analyses of neural crestopathy", Juntendo Medical Journal, 2009, 55, pages 34 to 39, particularly, summary, Paragraph of 'method for producing BAC transgenic mice'	7,8
Y	GONG, S., et al., Highly Efficient Modification of Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) Using Novel Shuttle Vectors Containing the R6K γ Origin of Replication, Genome Research, 2002, 12, pp.1992-1998, particularly, summary, fig. 1 to 3	7,8
Y	YANG, X., et al., Homologous recombination based modification in Esherichia coli and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome, Nature Biotechnology, 1997, 15, pp.859-865, particularly, summary, fig. 1 to 3	7,8
Y	HUBER, T.B., et al., Interaction with Podocin Facilitates Nephtrin Signaling, J. Biol. Chem., 2001.11.09, 276(45), pp.41543-41546, particularly, summary, page 41543, paragraph of 'Cloning of Mouse Podocin'	7,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/068238

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Keisuke SUGIMOTO, "The pathogenesis of interstitial pneumonia and the role of cytokines", Journal of Okayama Medical Association, 1994, 106, pages 641 to 654, entire text, particularly, Subject and Method, fig. 2, 4 to 7	11
Y		9,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/068238

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Database (Medical and Pharmaceutical
Proceedings Full-Text Database)Minimum documentation searched (classification system followed by
classification symbols)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/068238

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: (See extra sheet.)</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/068238

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

With respect to Box No. III:

Claims 1 to 8, claim 9, claim 10 (with respect to claim 10, see the following statement too) and claim 11 have a common technical feature "human TGF β 1".

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in, for example, the document 1, 2 and 3.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions.

Accordingly, claims are classified into three inventions each of which has a special technical feature indicated below.

Document 1: JP 2006-6103A (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 12 January 2006 (12.01.2006)

Document 2: Shoko HARA et al., Journal of Clinical and Experimental Medicine, 04 September 2010 (04.09.2010), 234(10), pages 977 to 982

Document 3: JP 2013-94071 A (Mie University), 20 May 2013 (20.05.2013)

(Invention 1) claims 1-8

A non-human transgenic mammal comprising the promoter region of non-human mammalian Podocin and the whole gene region of human transforming growth factor β 1 (human TGF β 1) which is arranged downstream thereof and the expression of which is controlled (claims 1 to 6), and a method for constructing the same (claims 7 and 8).

(Invention 2) claims 9 and 10

A method for evaluating the pathogenic state of a human TGF β 1-expressing transgenic mouse (claim 9), and a kit for performing the method (claim 10).

(Invention 3) claim 11

A kit for diagnosing human fibrosis.

With respect to claim 10:

Claim 10 states "a kit for performing a method for evaluating the pathogenic state of a human TGF β 1-expressing transgenic mouse as claimed in claim 7". However, claim 7 claims "a method for constructing a transgenic mouse as claimed in as claim 3 or 4". That is, there is no consistency between these statement, which makes the invention according to claim 10 unclear.

Taking the statements in other claims into consideration, it is understood that the aforesaid statement in claim 10 is clearly a mistake for "a kit for performing a method for evaluating the pathogenic state of a human TGF β 1-expressing transgenic mouse as claimed in claim 9". Thus, the present report was prepared on the assumption that claim 10 is described as discussed above.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 8 2 3 8									
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, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
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, C12N15/09, G01N33/53											
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 <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>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015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	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOIS/WPIDS (STN), 医学・薬学予稿集全文データベース (Medical and Pharmaceutical Proceedings Full-Text Database)											
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 請求項の番号									
Y	MACARY, G., et al., Transgenic mice expressing nitroreductase gene under the control of the podocin promoter: a new murine model of inductible glomerular injury, Virchows Arch., 2010, 456, pp.325-337, 全文, 特に要旨, Materials and methods, 図1, 2, 5	1-8									
Y	JP 2006-6103 A (大正製薬株式会社) 2006.01.12, 全文, 特に特許請求の範囲, 実施例, 【0010】 (ファミリーなし)	1-8									
<input checked="" 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」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 04.09.2015		国際調査報告の発送日 15.09.2015									
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) 荒木 英 則	4B 9736								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2015/068238

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 請求項の番号
Y	井上 勉, Transforming Growth Factor-beta(TGF-β)との拮抗作用による Hepatocyte Growth Factor (HGF) の抗腎線維化作用の検討, 埼玉医科大学雑誌, 2002.01, 29(1), pp.13-26, 特に要旨, 緒言	1-8
Y	LIU, S.-F., et al., Dioscorea alata Attenuates Renal Interstitial Cellular Fibrosis by Regulating Smad- and Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling Pathways, PLoS ONE, 2012.11.08, 7(11), e47482, 特に要旨, introduction	1-8
Y	原 詳子ら, TGF-βと線維症, 医学のあゆみ, 2010.09.04, 234(10), pp.977-982, 全文, 特に要旨, 図1	1-8
Y	JP 2013-94071 A (国立大学法人三重大学) 2013.05.20, 全文, 特に特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-10
Y	赤澤 智宏ら, BAC トランスジェニックマウス作成法を用いた Neural Crestopathy (神経堤関連疾患) 解析の新規モデルマウス作成, 順天堂医学, 2009, 55, pp.34-39, 特に要旨, 「BAC トランスジェニックマウス作成法」の項	7, 8
Y	GONG, S., et al., Highly Efficient Modification of Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) Using Novel Shuttle Vectors Containing the R6Kγ Origin of Replication, Genome Research, 2002, 12, pp.1992-1998, 特に要旨, 図1-3	7, 8
Y	YANG, X., et al., Homologous recombination based modification in Esherichia coli and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome, Nature Biotechnology, 1997, 15, pp.859-865, 特に要旨, 図1-3	7, 8
Y	HUBER, T.B., et al., Interaction with Podocin Facilitates Nephtrin Signaling, J. Biol. Chem., 2001.11.09, 276(45), pp.41543-41546, 特に要旨, 41543頁「Cloning of Mouse Podocin」の項	7, 8
X	杉本 啓介, 間質性肺疾患の病態に関する研究 -気管支肺胞洗浄液中サイトカインの検討-, 岡山医誌, 1994, 106, pp.641-654,	11
Y	全文, 特に対象と方法, 図2, 4-7	9, 10

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 8 2 3 8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

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。

(別紙参照)

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。

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。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

○第 III 欄について

請求項 1-8、請求項 9 及び 10 (なお、請求項 10 に関しては以下の記載も参照のこと。)、並びに請求項 11 は、「ヒト TGF β 1」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、例えば以下の文献ア、イ、及びウ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はないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。そして、請求の範囲は、各々下記の特別な技術的特徴を有する 3 の発明に区分される。

ア JP 2006-6103 A (大正製薬株式会社) 2006.01.12

イ 原 詳子ら, 医学のあゆみ, 2010.09.04, 234(10), pp.977-982

ウ JP 2013-94071 A (国立大学法人三重大学) 2013.05.20

(発明 1) 請求項 1-8

非ヒト哺乳類の Podocin のプロモーター領域と、その下流に配置されて発現を制御されるヒト形質転換因子 β 1 (ヒト TGF β 1) の全遺伝子領域とを含む非ヒト・トランスジェニック哺乳類 (請求項 1-6) 及びその作成方法 (請求項 7、8)。

(発明 2) 請求項 9、10

ヒト TGF β 1 発現トランスジェニックマウスの病態評価方法 (請求項 9)、及び、当該方法を実施するためのキット (請求項 10)。

(発明 3) 請求項 11

ヒトの線維症を診断するキット。

○請求項 10 について

請求項 10 には「請求項 7 に記載のヒト TGF β 1 発現トランスジェニックマウスの病態評価方法を実施するためのキット」と記載されているが、請求項 7 に記載されているのは「請求項 3 または 4 に記載のトランスジェニックマウスの作成方法」であるから、両者が整合のとれた記載となっておらず、請求項 10 に係る発明が不明確なものとなっている。

なお、他の請求項の記載からみて、請求項 10 の上記記載は「請求項 9 に記載のヒト TGF β 1 発現トランスジェニックマウスの病態評価方法を実施するためのキット」の明らかな誤りであると解されるので、本書類の作成に際しては、このように記載されたものと解して判断を行った。

 フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA15 AA24 AA25 AA26 AA29 BA13 BA14 BB24 CA12
 CA15 CA16 CA18 CA25 CA26 CB01 CB03 CB07 CB11 CB12
 CB17 CB26 DA09 DA13 DA14 DA20 DA31 DA36 DA42 FA16
 FA19 FB01 FB03 FB05 FB08 FB09 FB15 GC12 HA06

(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。